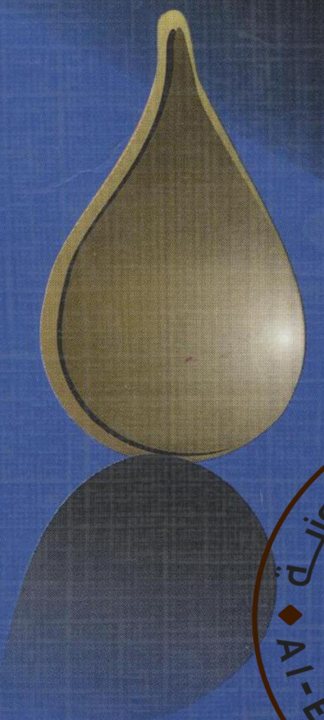
التحاليل الطبيعية والكيماوية

للزيوت والدهون

دكتور
رضوان صدقى فرج محمد



ABC
المكتبة الأكاديمية

التحاليل الطبيعية والكيماوية

للزيوت والدهون

حقوق النشر

المكتبة الأكاديمية

١٢١ ش التحرير - الدقى - القاهره

تليفون: ٣٤٨٥٢٨٢ / ٣٤٩١٨٩٠

تلكس: ABCMN U N ٩٤١٢٤

فاكس: ٣٤٩١٨٩٠ - ٢٠٢

التحاليل الطبيعية والكيماوية

للزيـوت والـدهـون

تأليف

دكتور/ رضوان صدقى فرج محمد

أستاذ الكيمياء الحيوية - كلية الزراعة

جامعة القاهرة

الناشر

المكتبة الأكاديمية

١٩٩٥

إهداء

إلي أسرتى الغالية

وفاءا واعترافا بفضلها وتضحيتها بوقتها

لاتمام تأليف هذا الكتاب

محتويات الكتاب

الفصل الأول

اللبيبدات

تعريف الليبدات ١٤

تقسيم الليبيدات ١٥

المذيبات والاجهزة الشائعة وتقسيم الليبيدات ٢٢

طرق تبخير المذيبات ٢٨

استخلاص الليبيدات ٣٠

تقدير الليبيدات كمياً ٣٥

الفصل الثاني

التعريف علي نوعية الزيت أو الدهن ٤١

الخصائص الطبيعية والكيماوية لبعض الزيوت والدهون ٤٣

نقطة الانصهار ٤٤

معامل الانكسار ٤٤

نقطة التعكير ٤٦

اللون ٤٩

التحويل الضوئى ٥١

تقدير الاحماض الدهنية الحرة ٥٣

رقم التصبن ٥٥

الرقم اليودي ٥٦

رقم الايدروكسيل ٦١

الاختبارات الخاصة المميزة للزيوت ٦٥

تركيب الاحماض الدهنية والمواد غير المتصبنة لبعض الزيوت ٧٣

التعرف علي نوعية الأحماض الدهنية ٧٨

المواد غير المتصبنة . ٧٩

الفصل الثالث

التزنخ	٨٣
الطرق المستخدمة لتقدير ثبات الزيوت والدهون	٨٤
اختيار سيلفستر	٨٨
طريقة فاربورج	٩٠
طريقة الاكسجين النشط	٩٥
جهاز الرانسيمات	٩٨
البيروكسيد	١٠٣
اختبار كريس	١٠٥
اختبار شتال	١٠٦
رقم الانيزيدين	١٠٦
رقم التوكوكس	١٠٨
رقم حامض الثيوبار بيتيوريك	١٠٩

الفصل الرابع

مشتقات الجلسريدات الثلاثية	١١١
التفاعلات مع الروابط الزوجية	١١١
تفاعلات روابط الاستر	١١٨
التفاعل مع مجاميع الهيدروكس - الايبوكسي - الكيتونيه	١١٨

الفصل الخامس

البلوره الجزيئية	١٢١
الطرق	١٢٢
التطبيقات	١٢٦
الفحص الميكروسكوبي للبلورات	١٣٩
الاختبار الكيميائي للبلورات	١٤١

الفصل السادس

الادمصاص الكروماتوجرافي باستخدام أيون الفضه ١٤٥

الطرق ١٤٥

التطبيقات ١٥٣

الفصل السابع

تفاعلات الازالة الجزئية لاسيل الاحماض الدهنية ١٥٩

الطرق الكيماوية لنزع مجاميع الاسيل ١٦٠

الطرق الانزيمية لازالة مجاميع الاسيل ١٦٢

الفصل الثامن

التعرف علي توزيع الاحماض الدهنية في جزيء الجلسريدات الثلاثية ١٦٧

طريقة بروكرهوف للجلسريد الثنائي ١، ٢ - و ٢، ٣ ١٦٧

طريقة بروكرهوف للجلسريدات الثنائي ١، ٣ ١٦٩

طريقة لاندس ١٦٩

فسفرة الجلسريدات الثنائية ١٧٢

التطبيقات ١٧٤

الفصل التاسع

الكروماتوجرافى الغازي ١٧٩

الفصل العاشر

الطرق الطبيعية لتعيين التركيب الكيماوي لليبيدات ١٨٧

الطرق ١٩٢

التطبيقات ١٩٢

تحليل الليبيدات باستخدام الاشعة تحت الحمراء ١٩٥

١٢ – الكروماتوجرافي الغازي .

١٣ – الطرق الطبيعية لتعيين التركيب الكيماوي لليبيدات .

١٣ – ١ – الطرق .

١٣ – ٢ – التطبيقات .

١٣ – ٣ – تحليل الليبيدات باستخدام الاشعه تحت الحمراء .

١٣ – ٣ – ١ – تحضير العينات .

١٣ – ٤ – طيف الليبيدات .

١٤ – المراجع .

بسم الله الرحمن الرحيم

مقدمة

يتناول هذا الكتاب بعض الموضوعات التي تهم الذين يقومون بابحاث في مجال الليبيدات اكاديميا وتطبيقيا - والموضوعات التي تناولها هذا الكتاب تشتمل علي إعطاء فكرة بسيطة عن التركيب الكيماوي للمركبات الليبيدية المختلفة وعلاقة هذه التركيبات مع خواصها القطبية وهذا يتبعه توضيح المشاكل عند اختيار المذيب المناسب لاستخلاص الليبيدات من مصادرها الطبيعية كميا وبدون تغير في تركيبها الكيماوي .

وذكرت الطرق المختلفة التي تستخدم في معرفة النوع والمصدر الطبيعي الذي تم استخلاص الليبيدات منه وكذلك التأكد من عدم حدوث اي تغيير في تركيب الليبيدات بعد الحصول عليها من مصادرها العديده قبل اجراء التحليلات الكيماوية المختلفة عليها والتي ترتبط ارتباطا وثيقا بمحتواها من الاحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة - وتشتمل التحليلات الكيماوية علي عملية البلورة وتطبيقاتها - الطرق الكروماتوجرافيه التي تعتمد علي خاصية الادمصاص لفصل الجلسريدات الثلاثية ومتشابهاتها وايضا تطبيقاتها - كما شرح بالتفصيل الطرق الكيماوية والانزيمية التي تستغل لمعرفة توزيع الاحماض الدهنية علي جزىء الجلسرول والتي ترتبط ارتباطا واضحا بخواص الليبيدات الطبيعية - واعطيت فكرة بسيطة عن استخدام اجهزة التحليل الكروماتوجرافي الغازي والامتصاص الطيفي لمعرفة مكونات الليبيدات من الاحماض الدهنية واهم المجاميع الفعاله التي توجد بها - وفي جميع الاحوال تم ذكر الاساس النظري ثم الطريقة العملية لاجراء أى نوع من التحليلات الكيماوية علي المركبات الليبيدية .

ونسأل الله ان يساهم هذا الكتاب ولو بالقدر القليل في اعطاء العاملين في مجال الليبيدات المعلومات اللازمة التي تساعد في البحث العلمي وتطبيقاته .

الفصل الأول

الليبيدات Lipids

تعتبر الليبيدات أحد المركبات العضوية الثلاث الاساسية المكونة للكائنات الحية وتحتوي تقريبا كل الكائنات الحية علي البروتينات – الكربوهيدرات والليبيدات وتختلف نسب هذه المكونات تبعا لنوع الكائن الحي .

وبصفه عامة تستعمل كلمة الدهن Fat للدلالة علي المادة التي لا تذوب في الماء ولها خواص شمعية الملمس – وكلمة زيت Oil تدل علي الحالة الطبيعية فقط التي توجد عليها الماده أي سائله علي درجة حرارة الغرفة وهي لا تدل مطلقا علي التركيب الكيماوي لها ويجب التفرقه ما بين كلمة زيت وزيوت عطرية Essential Oils وزيوت معدنية Mineral oils وزيوت مصهورة Fused oils ولذلك يطلق علي كلمة زيت في بعض الأحيان الزيوت الدهنية أو الزيوت الثابته Fixed oils .

وتوجد عدة إختبارات للتعرف علي وجود الليبيدات منها : –

١ – تكون الليبيدات بقع شمعية Greasy ولا تذوب في الماء وتطفو علي سطح الماء حيث أن كثافتها النوعية تقع ما بين ٨٧ . ٠ – ٩٧ . ٠ .

٢ – توجد عدة تفاعلات لونية للتعرف علي الليبيدات منها أن المواد الدهنية تصبغ بواسطة صبغة سودان III (تذاب ٠١ . ٠ جم صبغة في ٥سم^{٣} كحول (٩٥٪) + ٥ سم^{٣} جلسرول) وهذا التفاعل يعطي ايضا نتيجة موجبة مع البروتين .

٣ – عند تسخين كمية قليلة من المواد الدهنية مع ضعف وزنها بيكبريتيت الصوديوم فانه يتصاعد غاز الاكرولين ذو الرائحة المميزة – كما أنه عند تسخين الزيت مع الرمل Sand فانه تتصاعد غازات محتوية علي أكرولين الذي يعطي إختبار موجب مع جوهر كشاف شيف ويختزل محلول نترات الفضة الامونيومي .

٣ – عند وضع كمية قليلة من المواد الدهنية علي شريحة ميكروسكوب ثم يضاف اليها نقطة من مخلوط مركز من البوتاسا الكاوية والامونيا أو محلول إيثلات الصوديوم ثم تغطي بغطاء الشريحة Cover فانه تظهر بلورات ابرية بعد يوم في حالة المواد الدهنية .

تعريف الليبيدات : Definition

تعرف الليبيدات بانها المركبات التي لا تذوب في الماء وتذوب في مذيبات الدهون العضوية والمذيبات المستخدمة في إستخلاص الليبيدات تشمل – الاثير – إيثير البترول – الاسيتون – الكلوروفورم – البنزين – الكحول – البيوتانول المشبع بالماء وتحتوي علي احماض دهنية كجزء من مكوناتها .

وهذا التعريف ليس مطلق ويتضح ذلك من خلال الامثلة التالية :-

* الاستيرولات والاسكوالين والكاروتينات تذوب في مذيبات الدهون ولا تحتوي علي احماض دهنية .
* الجانجليوسيدات Gangliosides تذوب في الماء وخليط الماء والكحول ولا تذوب في كثير من المذيبات العضوية المستخدمة في استخلاص الليبيدات وتحتوي علي احماض دهنية.

ومن هنا يتضح ان تقسيم الليبيدات أمر صعب وذلك لطبيعتها الغير متجانسة .

والنظام الاكثر استخداما لتجنب تلك الصعوبات هو النظام المقترح بواسطة العالم Bloor.

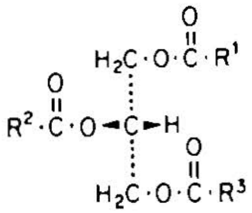
تقسيم الليبيدات

أولاً : الليبيدات البسيطة Simple Lipids

مركبات تتكون فقط من نوعين من التركيبات الكيماوية المختلفة مثل :

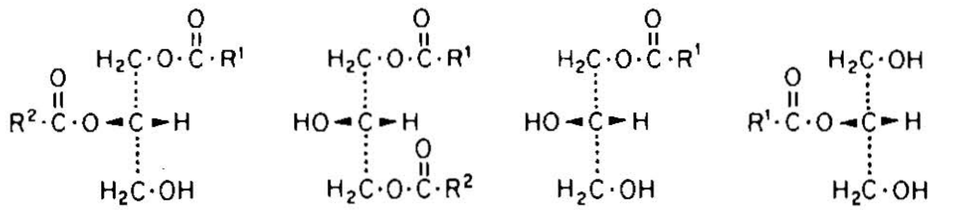
١ - استرات الجليسرول Glyceryl esters

هي استرات جليسرول مع حامض دهني وتشتمل علي الجليسريدات الثلاثية والثنائية والاحادية .



(a) 1,2,3-triacyl-*sn*-glycerol

Triglycerides

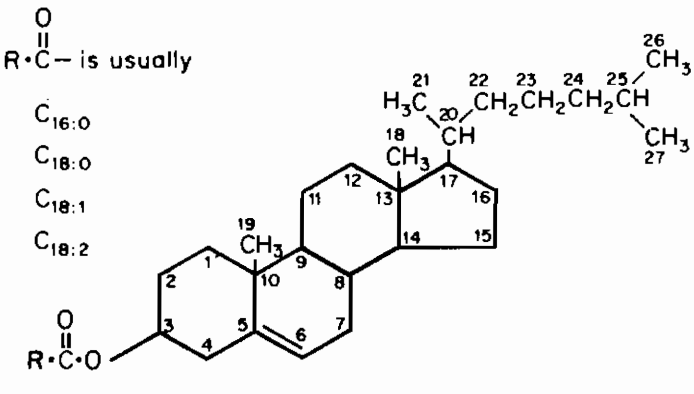


(b) 1,2-diacyl-*sn*-glycerol (c) 1,3-diacyl-*sn*-glycerol (d) 1-monoacyl-*sn*-glycerol (e) 2-monoacyl-*sn*-glycerol

Diglycerides — Monoglycerides

٢ - استرات الكوليستيرول Cholesteryl esters

تتكون من الكوليسترول والاحماض الدهنية .



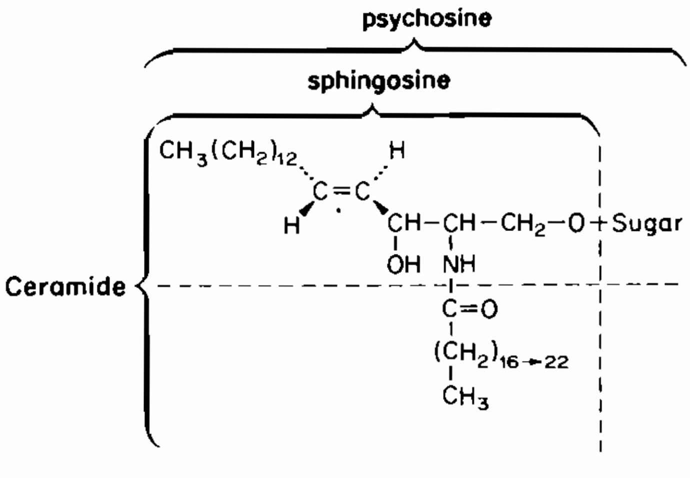
٣ - الشموع : Waxes

عبارة عن إسترات الكحولات طويلة السلسلة مع الاحماض الدهنية .

٤ - السيراميدات : Ceramides

عبارة عن أميد يتكون من إتحاد قاعدة إسفنجوزين أو مشتقاتها مع حامض دهني مرتبطين بروابط أميدية .

والمركبات المتكونة من الاسفنجوزين هي الاكثر شيوعا .



ثانيا : الليبيدات المركبة : Compound Lipids

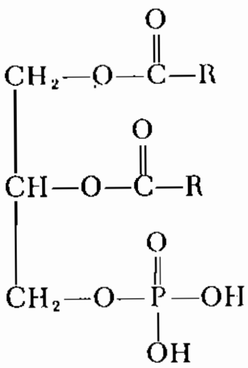
عبارة عن مركبات تتكون من أكثر من نوعين من التركيبات الكيماوية المختلفة .

أ - فوسفاتيدات الجليسرول : Glyceryl phosphatids

مركبات مشتقة من حامض الفوسفاتيديك .

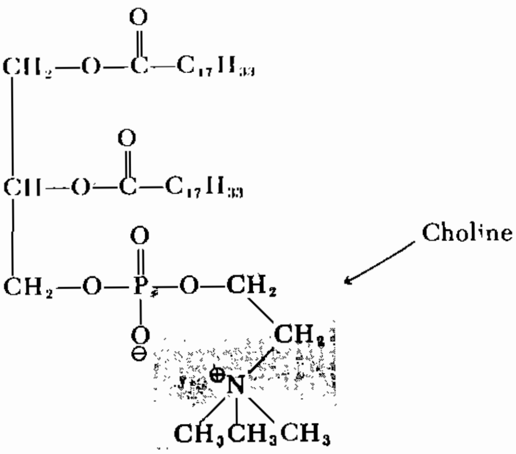
١- حامض الفوسفاتيديك : Phosphatidic acid

عبارة عن جليسريد ثنائي متحد مع حامض الفوسفوريك .



٢ - فوسفاتيديل كولين : Phosphatidyl Choline

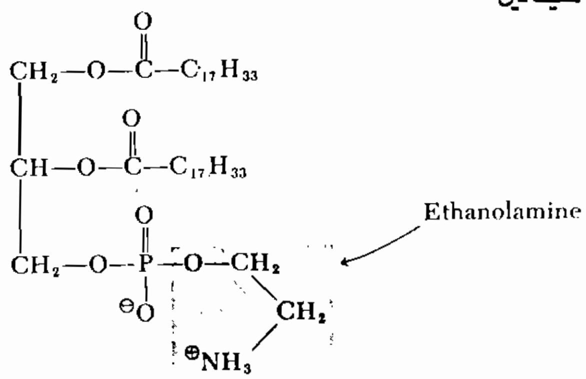
يتكون من حامض فوسفاتيديك مرتبط بقاعدة كولين .



Lecithin

٣ - فوسفاتيديل ايثانول امين : Phosphatidyl ethanol amine

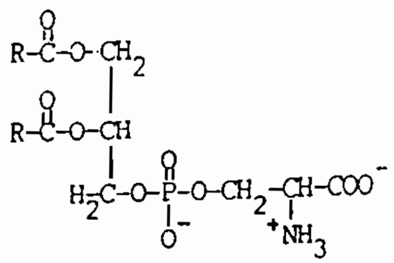
ويسمي خطأ سيفالين



Cephalin

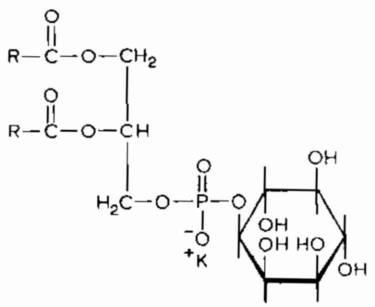
٤ - فوسفاتيديل سيرين : Phosphatidyl serine

يسمي خطأ ايضا سيفالين - وهي عبارة عن جلسريد ثنائي متحد مع حامض فوسفوريك وحامض أميني سيرين .



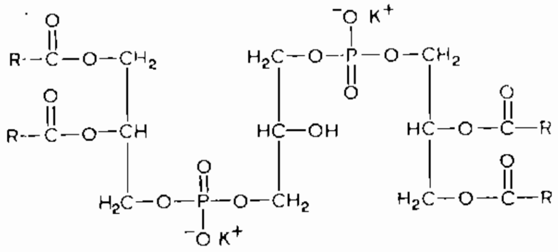
٥ - فوسفاتيديل اينوزيتول : Phosphatidyl Inositol

قسم أساسي من مركبات الفوسفاتيدات المعقدة المحتوية إينوزيتول ومجموعة أو أكثر من الفوسفات .



٦ - ثنائى فوسفاتيديل جليسرول : Diphosphatidyl glycerol

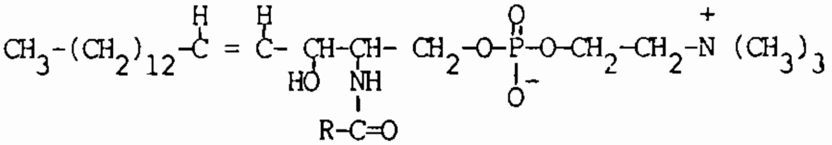
ويطلق عليه أيضا كارديوليبين



ب - سفنجوليبيدات : Sghingolipids

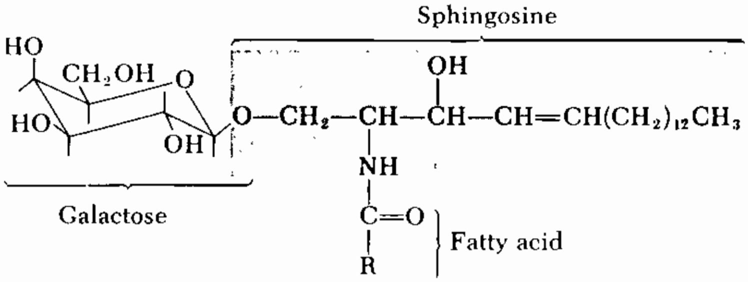
وهي مشتقات السيراميد

ا - سفنجوميلين : Sphingomyelin



٢ - سربروسيدات : Cerebrosides

سيراميد مرتبط مع سكر أحادى ويعرف بسيراميد أحادى السكر



Cerebroside

٣ - سيراميد ثنائي السكر : Ceramide dihexoside

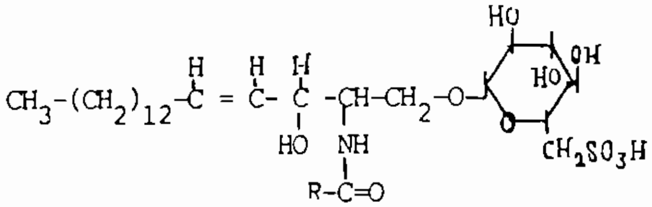
نفس التركيب السابق ولكن يرتبط السيراميد مع سكر ثنائي .

٤ - سيراميد عديد السكرات : Ceramide poly hexoside

نفس التركيب السابق ولكن مرتبط مع أكثر من ٣ وحدات سكر أحادي .

٥ - كبريتات السيربروسيد : Cerebroside sulphate

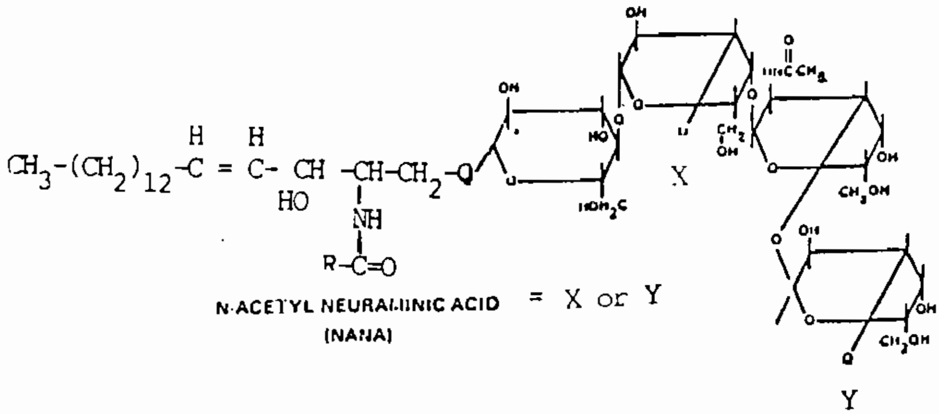
سيراميد مرتبط مع سكر أحادى مرتبط برابطة إستر بمجموعة كبريت .

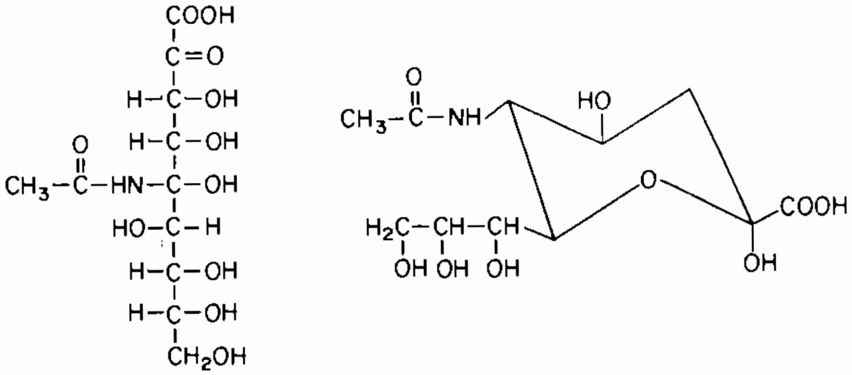


٦ - الجانجليو سيدات : Gangliosides

ليبيدات سكرية معقدة تشبه السيراميد عديده السكريات ولكن تحتوي أيضا علي حامض السياليك .

ومعظمها يحتوي علي سكر أميني بالاضافة إلي سكريات أخري ولكن ليس معني ذلك أن كل الجانجليوسيدات تحتوى على سكريات أمينية .





Open form　　　　Ring form

ثالثاً : الليبيدات المشتقه : Derived Lipids

هى مركبات تحتوي علي تركيب كيماوي واحد من الليبيدات كجزء في تكوينها .

" أي هي المركبات التي توجد مكونة للانواع المختلفة من الليبيدات "

المذيبات والأجهزة الشائعة في تحليل الليبيدات

المذيبات : Solvents

نظرا للحساسية الشديدة لطبيعة الليبيدات للاكسدة والتحليل المائي فانه لا بد من استخدام مذيبات عضوية عالية في النقاوة وخالية تماما من الشوائب فاذا إحتوى مذيب ما علي ٠٠١ر٪ شوائب من المواد الغير الطيارة الضارة وإستخدم في استخلاص الليبيدات فان كميات كبيرة من هذه المذيبات عند تبخيرها يصبح تركيز هذه المواد الضارة محسوسا وتتضح المشكلة بدرجة كبيرة عند تحليل الليبيدات باستخدام GLC أو TLC أو IR أو NMR أو Mass spec-trometry التي تمتاز بحساسيتها العالية .

وللتغلب علي الصعوبات يجب إتباع الاتي :

١ - استخدام مذيبات ذات درجة عالية من النقاوة .

٢ - تقطير كل المذيبات قبل الاستخدام مع إستبعاد ١٠٪ في بداية ونهاية عملية التقطير.

٣ - تخزين المذيبات المقطرة في عبوات زجاجية بنية اللون .

والمذيبات الاتية لا يتطلب منها الا التقطير البسيط قبل الاستعمال وتظل ثابتة لعدة أشهر :

البنزين - التولوين - رابع كلوريد الكربون - خلات الايثايل - الاسيتون .

أما المذيبات الاخري فانها تحتوي علي مواد ضارة تظهر أثناء التخزين ومن أمثلة ذلك :

١ - الألدهيدات :

توجد في الكحولات وهي تتفاعل مع مجاميع الأمين ، الهيدروكسيل أو مجاميع المثيلين النشطة في جزيء الليبيدات .

٢ - الفوسجين $COCl_2$

يظهر في الكلوروفورم وثنائي كلوروميثان وهو يتفاعل مع مجاميع الامين والهيدركسيل في جزيء الليبيدات .

٣ - البيروكسيدات :

وتظهر في الاثير واثير البترول وهي تعمل علي أكسدة الرابطة الزوجية في الليبيدات .

والطرق التالية تبين كيفية إزالة الشوائب الضارة السابق ذكرها من أهم المذيبات المستخدمة في مجال تحليل الليبيدات .

أولا : الكحولات

يتم التخلص من الالدهيدات التي تتكون في كل من الايثانول والميثانول (٩٥ – ٩٩٪) . وكحول البروبايل العادي ، كذلك الايزوبروبانول عن طريق التقطير في وجود إيدروكسيد بوتاسيوم KOH ويتم تخزين المذيبات في زجاجات بنية لمدة ١ – ٢ شهر .

ثانيا : المذيبات التي تحتوي علي كلور Chloronated solvents

يتم التخلص من الفوسجين $COCl_2$ من المذيبات التي تحتوي علي كلور مثل الكلوروفورم عن طريق الغسيل بالماء ثم التجفيف فوق كلوريد الكالسيوم ثم التقطير ولمنع تكوين الفوسجين مرة أخري يضاف ١٪ كحول ميثايل أو إيثانول ثم التخزين في زجاجات بنية ومن المعروف ان الكلوروفورم العالي النقاوة وكذلك التجاري والمحضر حديثا يكون خالي من الفوسجين لذلك يمكن تقطيره مباشرة دون الغسيل بالماء .

ثالثا : الإيثير والهيدروكربونات واثير البترول

Alkyl ether and hydrocarbons or petroleum ether

يمكن استخدام هذه المذيبات بعد إجراء عملية تقطير بسيطة خاصة إذا كانت لا تحتوي علي بيروكسيدات ، ويمكن إجراء إختبار بسيط للكشف عن البيروكسيدات في تلك المذيبات كالاتي : يرج ٢ سم٣ من المذيب مع ١ سم٣ محلول يوديد بوتاسيوم ١٠٪ " محضر حديثا " وعن طريق إضافة محلول النشا كدليل فاذا تكون اللون الازرق دل ذلك علي وجود البيروكسيدات (نتيجة لاكسدة البيروكسيدات لمحلول يوديد البوتاسيوم ينفرد يود يعطي لون أزرق مع النشا) .

وتوجد طريقة بديله Alternal method للكشف عن البيروكسيدات وهي :

١ – يذاب ١ ملجم ثاني كرومات البوتاسيوم في ١ سم٣ ماء في أنبوبة إختبار .

٢ – يضاف نقطة أو نقطتين من حمض كبريتيك مخفف .

٣ – تكمل أنبوبة الاختبار بالاثير وترج الانبوبة .

٤ - يتكون لون أزرق في طبقة ثاني كرومات البوتاسيوم والتي لا تمتزج مع الاثير دليل علي وجود البيروكسيدات .

يتم التخلص من البيروكسيدات عمليا برج ١ لتر مذيب مع ١٠٠ سم٣ محلول كبريتات حديدوز تركيزه ٢٠٪ في حمض كبريتيك ١ ع ثم يتبع ذلك الغسيل بـ ١٠٠ سم٣ ماء ثم التجفيف فوق كلوريد كالسيوم ثم التقطير .

أما بالنسبة لمذيب ايثايل إثير فيضاف الي المذيب ببطء وبحذر شديد ليثيوم الومنيوم هيدريد $Li\ Al\ H_4$ في حدود ٥ - ١٠ جم لكل ١٠٠ سم٣ مذيب ثم يسخن في وجود مكثف عاكس Reflux لمدة ١ - ٢ ساعة ويقطر .

إثيـر البتـرول Petroleum ether

عادة يحتوي إثير البترول علي هيدروكربونات غير مشبعة والتي تكون غير مرغوبة بسبب نشاطها . ويمكن التخلص من هذه الهيدروكربونات الغير المشبعة عن طريق الرج مع حامض كبريتيك مركز ويمكن إستخدام محلول برمنجنات بوتاسيوم وحامض كبريتيك والرج حتي يتم كسر المواد القابلة للاكسدة " الهيدروكربونات الغير مشبعة " ثم يجري بعد ذلك الغسيل بالماء ثم التجفيف فوق كلوريد كالسيوم والتقطير .

البنـزيـن أو التـولـويـن Benzene or toluene

يرج البنزين أو التولوين مع حامض الكبريتيك المركز (٨٠ سم٣ حامض كبريتيك مركز / لتر بنزين) في قمع فصل وعلي درجة حرارة الغرفة لمدة تتراوح من نصف - ١ ساعة ثم يتم سحب الجزء الحامضى المسود من أسفل القمع وتكرر هذه العملية مرتين باضافة جزء جديد من حامض الكبريتيك والرج حتي تصبح طبقة الحامض عديمة اللون ثم يغسل بالماء المقطر للتخلص من الحموضه ثم بعد ذلك ينقل البنزين الي دورق نظيف ويقطر .

والجدول (١) يبين أهم خصائص المذيبات الشائعة الاستخدام في تحليل الليبيدات :

الاسم	الرمز الجزئى	الوزن الجزئى	الكثافة	درجة الغليان (مْ)
أسيتون	C_3H_6O	٥٨.١	٠.٧٩٦ علي ١٥ مْ	٥٧
بنزين	C_6H_6	٧٨.٠٥	٠.٨٧٨ علي ٢٠مْ	٨٠.٢
رابع كلوريد الكربون	CCI_4	١٥٣.٨	١.٤٨٣ علي ٢٥ مْ	٧٦.٧
ثنائى كبريتيد الكربون	CS_2	٧٦.١٣	١.٢٩٢٧ علي ٢٠ مْ	٤٦
كلوروفورم	$CHCl_3$	١١٩.٣٨	١.٥٢٦ علي ٢٠ مْ	٦١.٢
ثنائي كلور وإيثان	$C_2H_4CI_2$	٩٨.٩٥	١.٢٥٧ علي ٢٠ مْ	٨٣.٨٤
هكسان	C_6H_{14}	٢٦.١	٠.٦٦٢ علي ١٧أم	٧١

الاوانى الزجاجية Glassware

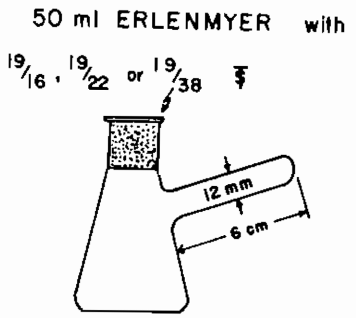
يجب إبعاد وتفادي أي مصدر للتلوث أثناء إجراء التجارب العملية علي الليبيدات وهذا المصدر ربما يكون متمثلا في الاجهزة المستعملة أو الادوات مثل الصنابير أو السدادات أو الوصلات . لذلك يجب عدم استعمال الشحوم ، البلاستيك أو اللدائن Plasticisers .

ويجب أن تتم جميع العمليات في أوانى من الزجاج ويجب أن تكون جميع الوصلات والسدادات من الزجاج مع إحكام القفل وعدم إستخدام الشحوم أو وصلات الكاوتشوك كذلك لا يستخدم سدادات من الفلين ، ويجب إستخدام صنابير مصنوعة من التفلون Teflon بعد إختبارها بالمذيب بحك جزء منها مع المذيب وملاحظة حدوث تآكل من عدمه لذلك يجب عدم إستخدام سدادات من الفلين أو المطاط أو البولي إثيلين للدوارق أو الانابيب بل يجب أن تكون من الزجاج فان كان ذلك غير متاح فيستعاض عن ذلك بأغطية من شرائح الالومنيوم .

دورق الاستخلاص والتحليل :

Combination hydrolysis and extraction flask

هذا الدورق مهم خاصة في عمليات التحليل المائي والميثه حيث يتم الفصل والاستخلاص لنواتج التحليل كميا في نفس الدورق . ويصنع الدورق (٥٠ سم ٣) من الزجاج المقاوم للحرارة وله عنق بمقاس (١٩/١٦ . ١٩/٢٢ ، ١٩/٣٨) وله أنبوبة جانبية سعة ٥ سم٣ (١٫٢ × ٦ سم) تقع عموديا علي جانب الدورق أسفل فوهة الدورق بحوالي ١ سم .



ويستخدم هذا الدورق اذا كانت العينة في حدود ١ر - ١٠٠ ملجم أما بالنسبة للعينات الكبيره فان الدورق يمكن أن يدرج في أبعاده ليكون مناسبا مثال ذلك دورق سعته ١٢٥ سم٣ له انبوبة جانبية ١٠ - ١٥ سم٣ يمكن إستخدامه لعينات أكثر من ٥ جم .

ولقد صمم هذا الدورق لاستعماله مع أي زوج من المذيبات الغير قابلة للامتزاج فاذا كان المطلوب إستخلاص الطبقة السفلي عدة مرات بواسطة الطبقة الاعلي . يضاف كميه من المذيب الأعلي كثافة (الجزء السفلي) تكفي لمليء الانبوبة الجانبية ثم يضاف بعد ذلك المذيب الاخف كثافة (الجزء العلوي) في حدود ٥ - ١٠ سم٣ ثم يرج الخليط ثم تترك فترة لكي ينفصلا عن بعضهما ثم يميل الدورق ببطء للوضع الافقي حيث تدخل الطبقة السفلي في الانبوبة الجانبية وفي نفس الوقت تخرج الطبقة العليا من الدورق حيث يجمع في كأس مناسب .

ثم يغسل فوهة الدورق بالمذيب ثم يرجع الدورق لوضعه الرأس ثم تضاف كمية أخري من المذيب العلوي ويكرر ما سبق أكثر من مرتين كلما دعت الضرورة وبذلك يمكن استخلاص كمي وسريع لكل من الطبقة العليا والطبقة السفلي .

طرق تبخير المذيبات Evaporatorion

توجد ثلاث طرق لتبخير المذيب في الليبيدات تعتمد علي كمية المذيب المطلوب تبخيره .

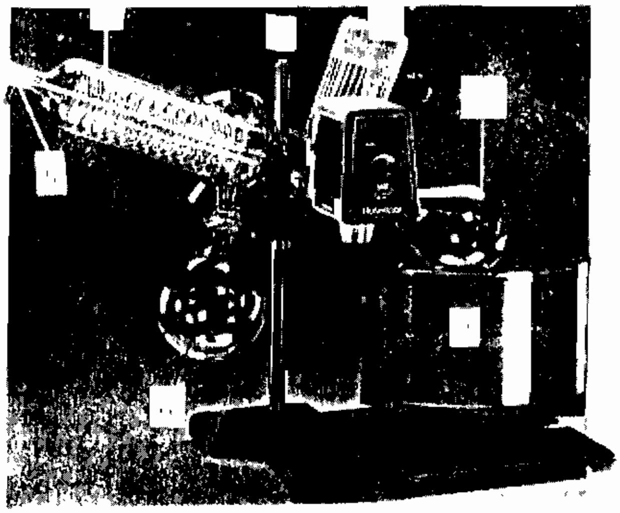
التبخير في وجود تيار من النتروجين Evaporation in a stream of N_2

تستخدم هذه الطريقة لتبخير أحجام صغيرة من المذيب (١٠ - ١٥ سم٣ أو أقل) الموجودة في أنبوبة صغيرة أو دوارق والطريقة الملائمة هو توجيه تيار من النيتروجين (N_2) فوق سطح المحلول الموجودة في حمام مائى درجة حرارته ٣٠ درجة مئوية .

المبخرات الدورانية Rotary evaporators

يعتبر التبخير باستخدام المتبخرات الدورانية هو الاجراء الاكثر كفاءة الي جانب أنه يستخدم لتركيز حجم كبير أو صغير من محاليل الليبيدات بسرعة علي درجة حرارة منخفضة وبدون حدوث تلوث للعينة بالشحوم أو الدهون وتتم عملية التبخير للمذيبات تحت تفريغ مع إستعمال مضخة مائية قادرة علي إعطاء تفريغ ١٠ - ٢٠ مم زئبق .

ويجب أن تكون درجة الحرارة في حدود ٣٠ - ٣٥ درجة مئوية أو أقل باستخدام حمام مائى ومنظم حراري .



ويتكون الجهاز من :

١ - دورق المبخر وسعته ٥٠٠ سم٣   ٢ - حامل معدني .   ٣ - موتور.   ٤ - مكثف قياسي .

٥ - أنبوبة ملىء يضاف خلالها باستمرار محلول العينة أثناء عملية التبخير .

٦ - قابلة للجزء المقطر   ٧ - حمام مائي مزود بثرموستات .

إحلال المذيب Solvent replacement

ويستخدم ذلك عند التخلص من أثار الماء في الكلوروفورم عن طريق إضافة البنزين الي الكلوروفورم . كذلك عند التخلص من الميثانول ، والماء ، AcOH عن طريق إضافة كميات صغيرة من الكلوروفورم ثم التبخير حتي الجفاف بين كل إضافة وأخري من الكلوروفورم .

إستخلاص الليبيدات Lipid extraction

الخطوة الاولي في تحليل الليبيدات هي فصل كل الجلسريدات الثلاثية من العينة الاصلية ودراسة الاحماض الدهنية الداخلية في تركيبها والتعرف عليها .

وتعتمد الدراسات الحيوية علي الطرق المتاحة لاستخلاص الليبيدات كميا من مصادرها بأقل قدر ممكن من التغير في تركيبها – والتغير الحادث في التركيب نتيجة للهدم والتكسير ربما يحدث أثناء تخزين العينة وكذلك أثناء الاستخلاص ويرجع ذلك Degradation لنشاط انزيمات الليباز : والفوسفوليباز ، والاكسيديز حيث أن بعضها يكون نشط تحت الصفر المئوى وأما التغيرات الكيماوية فتشمل التحليل المائى والاكسدة – لذلك فان الطريقة المثلي لاستخلاص الليبيدات هي التي تعمل علي إستخلاص كلي لليبيدات وأن تخلو من المواد المصاحبة مثل السكريات الحرة والاحماض الامينية وتعتمد الكفاءة العالية في الاستخلاص علي طبيعة التركيب الكيماوي Chemical nature لمكونات الليبيد ونوع الارتباط Kind of complex or association بينها وبين مكونات الخلايا وكما هو معروف أن الدهون تمتاز بصعوبة ذوبانها في الماء وقابليتها العالية للذوبان في المذيبات العضوية ومع ذلك وجد مدي واسع في خاصية ذوبان الليبيدات وذلك لاختلافها في التركيب الكيماوي مما جعل من المستحيل إختيار مذيب واحد شامل لاستخلاص الليبيدات والاستخلاص الناجح يعتمد علي إمكانية كسر الروابط بين الليبيدات والمركبات الاخري المصاحبة لها وبذلك يصبح الليبيد في صورة حره يسهل ذوبانها بعد ذلك وعموما هذه الدرجة من الاذابة يمكن أن تتحقق عندما تتشابه كل من قطبية الليبيد مع قطبية المذيب وبالتالي فان الجلسريدات الثلاثية الغير قطبية تذوب في المذيبات الغير قطبية مثل الهكسان وإثير البترول أما المركبات القطبية مثل الجليكوليبيدات فانها تذوب في الكحول .

أنواع الروابط التي تشترك فيها الليبيدات مع المواد المصاحبة في الخلايا .

توجد ثلاث أنوا ع رئيسية من الروابط في الليبيدات .

١ - إتحاد Van der Waals أو الإرتباط الكاره للماء

Van der Waals or hydrophobic association

ترتبط الليبيدات المتعادلة أو الغير قطبية مثل إسترات الاستيرولات – الجلسريدات – الهيدروكربونات والكاروتينات بواسطة روابط ضعيفة نسبيا غير تساهمية تسمي فان در

فالس أو إرتباط كارهه للماء من خلال الارتباط مع السلاسل الهيدروكربونية الجانبية للاحماض الأمينية . ومن أمثلة ذلك الارتباط الذي يحدث في أنسجة تخزين الدهون adi- pose tissue وكذلك الليبوبروتين من نوع Chylomicrons والمعقد المكون من الالبيومين مع الحامض الدهني .

٢ - الروابط الهيدروجينية ، الارتباط الالكتروستاتكي أو الاتحاد المحب للماء :

Hydrogen bonding, electrostatic and hydrophilic association

ترتبط الليبيدات القطبية والفوسفاتيدات ، والجليكوليبيدات مع البروتين بواسطة رابطة هيدروجينية أو الكتروستاتيكية أو هيدروفيليه ومن أمثلة ذلك كما في أغشية البلازما ؛ الميتوكوندريا ، النسيج الانوبلازمي ومعقد السيرم والليبوبروتين .

٣ - الرابطة التساهمية Covalent association

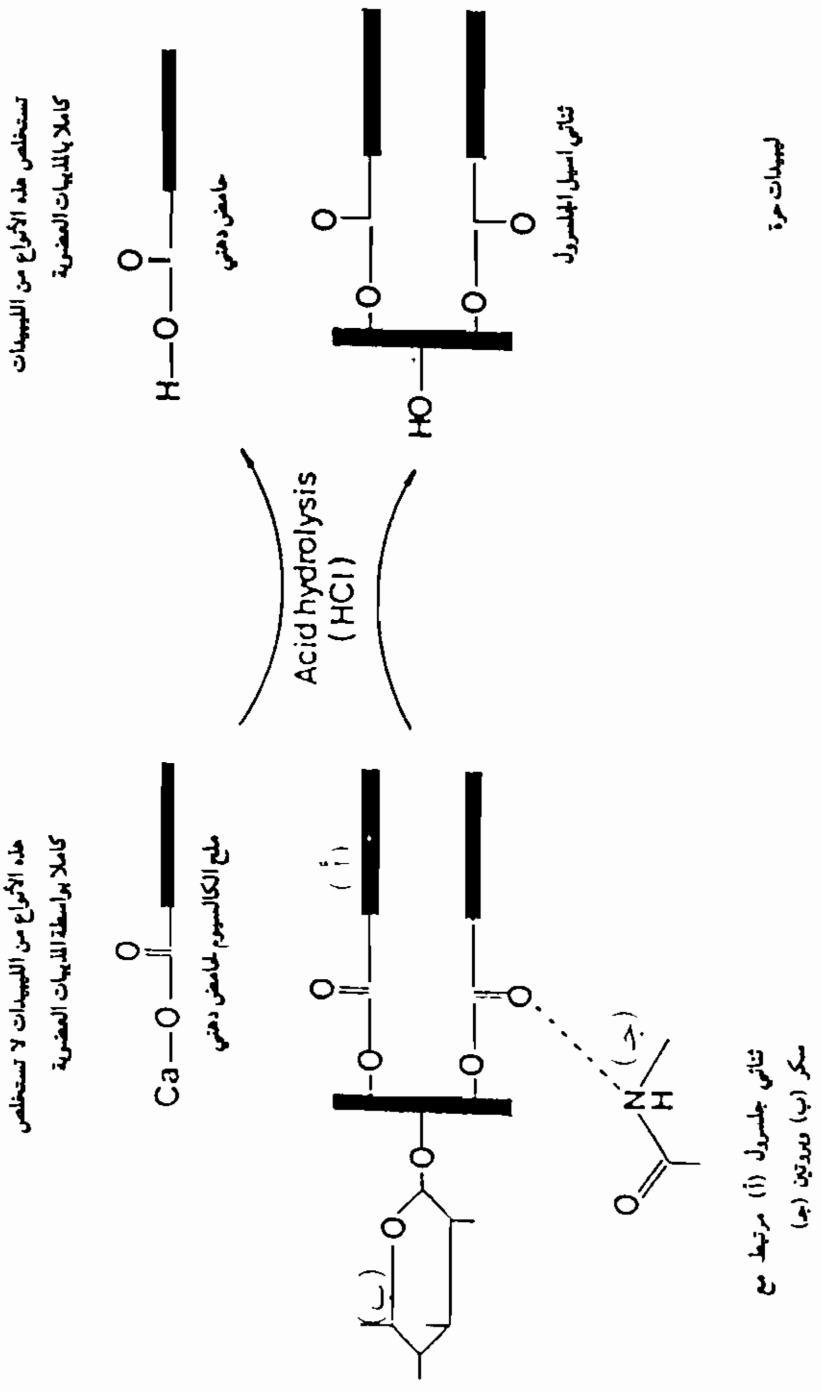
ترتبط الاحماض الدهنية ، الاحماض الهيدروكسيلية ، الاحماض المتفرعة برابطة تساهمية في صورة إستر أو رابطة أميدية أو رابطة جليكوسيدية مع مركبات السكرات العديدة ومن أمثلة ذلك الليبيدات المحتوية على سكر عديد في جدر أغشية خلايا البكتريا .

وعند الاستخلاص الكامل لليبيدات يجب الاخذ في الاعتبار الثلاث أنواع من الارتباط ولذلك:

١ - في حالة الليبيدات التي ترتبط برابطة ضعيفة وهي الكارهة للماء أو رابطة فان در فالس "غير قطبية " فإنه يمكن إستخلاصها بمذيبات غير قطبية مثل الاثير – البنزين – الكلوروفورم.

٢ - في حالة الليبيدات التي ترتبط برابطة هيدروجينية كما في الليبيدات المرتبطة بالأغشية فانه يمكن إستخلاصها بمذيبات قطبية مثل الايثانول والميثانول وذلك بكسر الروابط الهيدروجينية أو القوي الالكتروستاتيكية الموجودة بين الليبيدات والبروتين .

٣ - في حالة الليبيدات التي ترتبط برابطة تساهمية فانه لا يمكن استخلاصها مباشرة بأي مذيب ولكي يتم إستخلاصها لا بد أولا من فصلها من المعقد وذلك بالتحليل المائي بالحامض أو القلوي .



الرسم التخطيطي السابق بين انفراد الاحماض الدهنية المرتبطة كيماويا مع مكونات الخلايا بالتحليل المائى باستخدام حامض معدني .

ويجب مراعاة ما يلي عند استخلاص الليبيدات :

١ - تحدد طبيعة التركيب الكيماوي لليبيدات طريقة إستخلاصها .

٢ - لمنع أكسدة الروابط الزوجية يجب أن تكون كل المذيبات مقطره حديثا وخالية من البيروكسيدات قبل إستخدامها .

٣ - بالنسبة للزيوت العالية في درجة عدم التشبع يجب أن تستخدم لها مذيبات خالية من الهواء وذلك بأمرار تيار من النيتروجين خلال المذيب وكذلك فان عملية الاستخلاص والعمليات التالية لها يجب أن تتم في جو خامل خالي من الاكسجين (أي في وجود تيار من النتروجين) .

٤ - بعد عملية الاستخلاص يجب عدم تبخير المذيب الي الجفاف التام كما لا يجب أن يترك المستخلص علي هذه الحالة لفترة طويلة ، بل يجب أن ينوب بأسرع ما يمكن في مذيب مناسب .

٥ - يجب حفظ الليبيدات علي صورة محلول وعادة يستخدم الكلوروفورم الذي يحتوي علي ميثانول الذي يعمل كمضاد للاكسدة .

٦ - يجب أن تكون درجة حرارة عملية الاستخلاص في حدود درجة حرارة الغرفة أو أقل إذا كان ذلك ضروريا وذلك لمنع تكوين البيروكسيدات أو حدوث تفاعل التحلل المائي . وتلعب درجة الحرارة دورا أساسيا في عملية الاستخلاص فتؤدي درجة الحرارة المنخفضة إلي خفض أو قلة ذوبان بعض الليبيدات بينما إذا تمت عملية الاستخلاص علي درجة حرارة مرتفعة فان ذلك يؤدي إلي تنشيط الانزيمات مما يؤدي إلي تغير وكسر في التركيب الكيماوي لليبيدات خاصة وأن الليباز ينشط عند درجة حرارة أعلي من ٤٥ْم بينما إنزيم الفوسفوريليز ينشط باستخدام مذيبات معينة . لذلك فان طريقة سوكسلت الخاصة باستخلاص الليبيدات من الانسجة يجب تجنبها وعدم إستخدامها وذلك لانها تستخدم حرارة مرتفعة لعدة ساعات .

٧ - يحدث للعينات النباتية تحلل إنزيمي أثناء عملية الاستخلاص ولايقاف ذلك يفضل إستخدام الكحول ضمن مخلوط المذيبات المستخدم حيث أن الكحول كاف لايقاف نشاط كل من الفوسفوريليز والليباز أما الانزيمات الاكثر ثباتا عادة يوقف نشاطها بغمر النسيج لمدة ١- ٢ دقيقة في الكحول الساخن أو الماء المغلي .

مما سبق يتضح أهمية الكحول كمعاون لمذيب الاستخلاص وضروري للاسباب الآتية :

١ – يعمل علي كسر Disruption المعقد أو الرابطه بين الليبيدات والبروتين (الرابطه الايدروجينية).

٢ – يعمل علي إذابة Dissolution الدهون (ذات القطبية العالية مثل الجليكوليبيدات) .

٣ – يعمل علي وقف النشاط Inactivation الانزيمي (أو منع التحلل الانزيمي) .

٤ – تعتبر الكحولات مضادات للاكسدة Antioxidants .

لكن هناك عيب عند إستخدام الكحول كمذيب معاون في إستخلاص الليبيدات من الانسجة وهو أن يعمل الكحول علي استخلاص مواد مصاحبة اخري غير دهنية Water soluble contaminants مثل السكرات والاحماض الامينية والاملاح ولذلك يجب تخلص الزيت أو الدهون الخام المتحصل عليه بهذه الطريقة من المواد المصاحبة (الشوائب) والتي تنوب في الماء .

إعداد العينة لاستخلاص الليبيدات

Preparation of sample for lipid extraction

ليست هناك طريقة واحدة قياسية لاستخلاص الليبيدات والطريقة المستعملة تعتمد علي نوع الليبيد ومصدره وطبيعة الطرق التحليلية المراد القيام بها لذلك فان طريقة استخلاص الدهون من اللبن تعتبر بسيطة نسبيا بالمقارنة باستخلاص الدهون من الانسجة النباتية أو الحيوانية حيث أن الانسجة النباتية والحيوانية تحتاج الي بعض عمليات من الاعداد والتجهيز (تكسير الانسجة) مثل الطحن الميكانيكي ، التكسير بواسطة الموجات فوق الصوتية العالية – التجنيس ، الضغط وغيرها .

ومن أكثر الطرق كفاءة في إستخلاص الليبيدات والتي تتغلب علي كل العقبات السابق ذكرها هي طريقة Bligh and Dyer (1959) .

وفيها يتم مزج العينة مع مخلوط من الكلوروفورم والميثانول بنسبة ٢ : ١ حجم/ حجم . وهذا النظام قابل الامتزاج بالماء الموجود بالعينة التي سبق معاملتها بالكلوروفورم – ميثانول وأن أضافة كمية ملحوظة من الماء تعمل علي فصل مخلوط المذيب الي طبقتين (طبقة الكلوروفورم وهي تحتوي علي كل الليبيدات والطبقة الثانية هي طبقة الميثانول والتي تحتوي علي

كل المركبات الغير دهنية) . يتم فصل طبقة الكلوروفورم للحصول علي الليبيد النقي عن المواد الغير ليبيدية والذائبة في الماء (مثل الكربوهيدرات – الاملاح – الاحماض الامينية التي تستخلص من الانسجة مع الليبيدات) . أحيانا يتكون مستحلب عند السطح الفاصل بين الطبقتين وبذلك قد تهرب بعض الليبيدات وتظل في منطقة الاستحلاب لذلك يجب كسر هذا المستحلب ويتم ذلك بواسطة إضافة كميات من مخلوط الاملاح الذي يحتوي علي كلوريد كالسيوم (٠٢ر٪) ، كلوريد ماغنسيوم (١٧ر٪) كلوريد صوديوم (٢٩ر٪) أو كلوريد بوتاسيوم (٣٧٪) في ماء مشبع بالكلورفورم والرسم في صفحة ٣٦ يبين طريقة استخلاص وتقدير الليبيدات عمليا .

تقدير الليبيدات

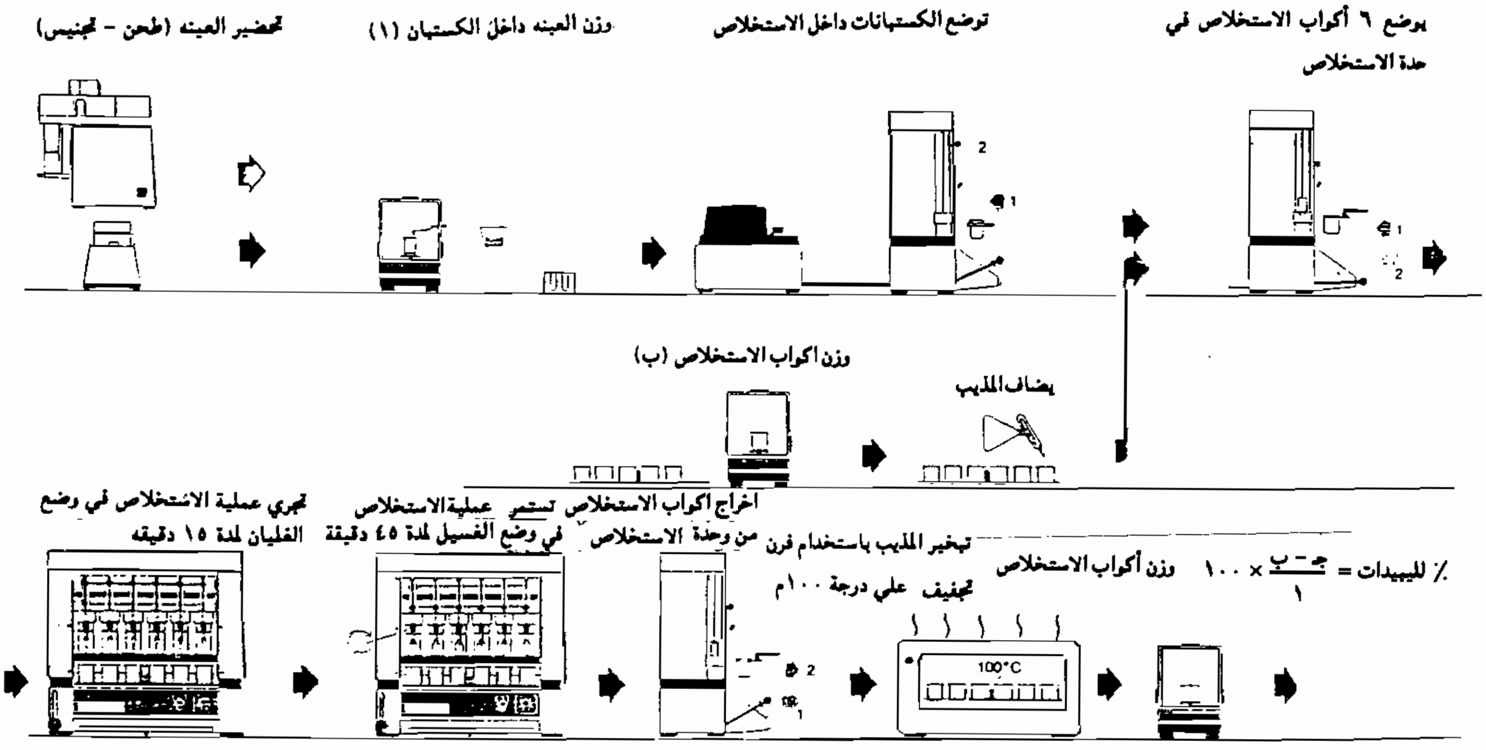
Lipid determination

هناك العديد من الوسائل والاساليب المختلفة المتاحة لتقدير محتوي الليبيدات بسرعة ويستخدم جهاز التردد النووي المغناطيسي Nuclear Magnetic Resonance spec. (NMR) في تحليل الزيوت في البذور وهذا فتح الطريق وأعطي فرصة عظيمة لعلماء الوراثة والتهجن في النبات حيث لا يحدث بهذه الطريقة أي تكسير في العينات أو هدم وهي طريقة سريعة ويمكن إستخدمها لتقدير محتوي الزيت لبذرة واحدة أو لكمية من البذور والقراءة المقاسة بجهاز NMR ترجع الي الهيدروجين الكلي للجزء الزيتي في البذرة ولا تتأثر بالهيدروجين الموجود في الجزء الغير زيتي ويتم حساب كمية الزيت عن طريق جداول أو منحنيات معايره .

وتوجد طرق لونية لتقدير الزيت حيث يعامل مستخلص الليبيدات بواسطة محلول قلوي لحامض الهيدروكساميك Hydroxamic وبعد ذلك تترك فترة للتفاعل ثم تحمض بحامض HCl ويضاف كلوريد الحديديك فيتكون لون ثابت نسبيا له أقصي إمتصاص عند طول موجي ٥٤٠ nm .

ومن التفاعلات اللونية التي تستخدم لتقدير الليبيدات الكلية كميا سواء في السيرم أو أي مستخلص يحتوي علي المواد الليبيدية هو تفاعل سلفو فوسفوڤانيلين Sulfo - phospho - vanillin (Knight et al, 1972) ويشترط لنجاح هذا التفاعل وجود مركب يحتوي علي رابطة زوجية بين ذرتي كربون – وفيما يلي خطوات هذا التفاعل :-

استخلاص الليبيدات بالمذيبات العضوية



١ – يتفاعل حامض الكبريتيك المركز مع الليبيدات غير المشبعة لتكوين أيون الكاربونيوم.

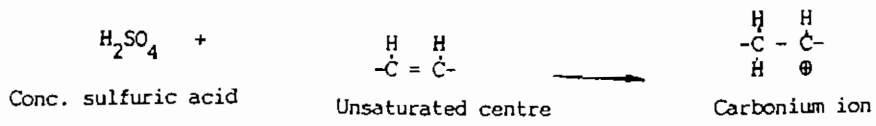
٢ – يتفاعل حامض الفوسفوريك مع الڤانيلين ليعطي إسترفوسفات عطري وهذا يؤدي إلي زيادة نشاط مجموعة الكاربونيل للڤانيلين .

٣ – يتفاعل أيون الكاربونيوم Carbonium مع مجموعة الكاربونيل النشطة للفوسفوڤانيلين ليتكون المركب الملون الثابت نتيجة لعملية التردد Resonance .

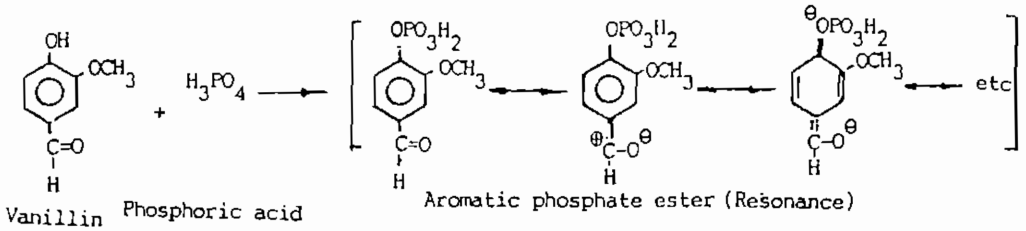
٤ – تتفاعل أيضا المركبات غير المشبعة المحتوية علي أكثر من رابطة زوجيه بنفس الطريقة ولكن تختلف طبيعة هذا التفاعل طبقا للاعاقه الفراغيه Steric hindrance .

تبين المعادلات التاليه كيفية تتابع هذا التفاعل :

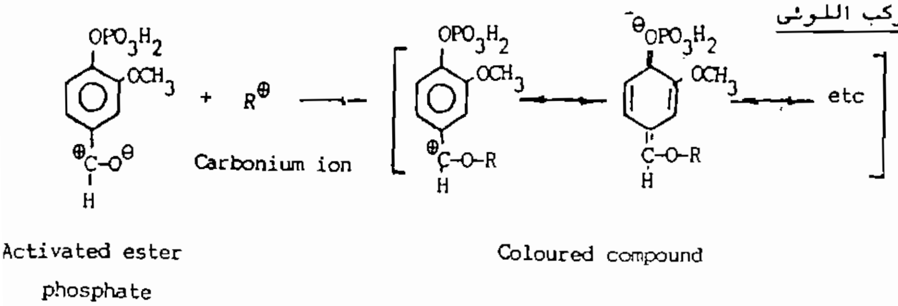
١– تكوين ايون الكربونيوم



٢– تكوين استرفوسفات عطرى



٣– تكوين المركب اللونى



الجواهر الكشافة Reagents

ا - الفوسفوڤانيلين

يذاب الڤانيلين (٦ر٠ جم) في كحول إيثايل مطلق (٨ - ١٠ سم٣) ثم يكمل الحجم بالماء المقطر الي ١٠٠ سم٣ - يضاف إلي هذا المحلول حامض فوسفوريك مركز (٤٠٠ سم٣) مع الرج المستمر - يحفظ المخلوط في زجاجه بنية علي درجة حرارة الغرفة .

ا - المخلوط القياسي من الليبيدات

يتكون هذا المخلوط من ٧٠٪ حامض أوليك ، ٣٠٪ حامض بالميتيك أو حامض إستياريك ويحضر بنسبة ١٪ باستعمال كحول إيثايل مطلق .

طريقة العمل Procedure

١ - يضاف ٥ سم٣ حامض كبريتيك مركز إلي أنبوبة إختبار تحتوي علي ٠.١ سم٣ سيرم أو مستخلص ليبيدي .

٢ - تسخن الأنبوبة ١٠ دقائق باستخدام حمام مائى يغلى - تبرد الانبوبة ثم يؤخذ منها ٠.٤سم٣ وتوضع في أنبوبة نظيفة وتعرف بالـ Unknown .

٣ - يجري عمل بلانك Blank بوضع ٤ر٠سم٣ حامض كبريتيك مركز في أنبوبة إختبار .

٤ - يضاف ٦ سم ٣ من الجوهر الكشاف الفوسفوڤانيلين لكل أنبوبه وتترك الأنابيب في الظلام لمدة ٤٥ دقيقة ثم تسجل قراءات الامتصاص عن طول موجة ٥٢٥٠

٥ - يجرى عمل منحني قياسي الذي يدل علي العلاقه بين الامتصاص عند طول موجه ٥٢٥ وتركيزات مختلفة من المخلوط القياسي لليبيدات ومنه نستنتج تركيز الليبيدات في العينات .

تخزين الليبيدات المستخلصة Storage of lipid extraction

نتيجة لتعرض الليبيدات للتحليل المائى أو تكوين البيروكسيدات نتيجة للاكسدة لذلك يفضل أو ينصح بعدم تخزينها لفترات طويلة أكثر ١ - ٢ سنة لاجراء الدراسات التحليلية عليها . لذلك فانه من الافضل إجراء تلك الدراسات التحليلية علي الليبيدات المستخلصة حديثا أو علي الأقل المخزنة لفترات قصيرة وذلك لأنه في هذه الحالة تكون النتائج أفضل .

في حالة تخزين الليبيدات علي فترات قصيرة عدة أسابيع فانه :

١ – يفضل نوبان الليبيدات في مخلوط من الكلوروفورم والميثانول بنسبة ٢ : ١ حجم / حجم بحيث يكون المذيب حديث التقطير ويخزن علي درجة تتراوح من صفر الي – ١٥ درجة مئوية .

٢ – يجب وضعها في عبوات زجاجية لها غطاء مصنفر .

٣ – تملىء هذه العبوات حتي النهاية (أي مملوءه حتي العنق) بالمذيب .

وفي حالة التخزين لفترات طويلة (١ – ٢ سنة) يجب اضافة مضادات للاكسدة مثل التوكوفيرول أو Butylated hydroxytoluene (BHT) بنسبة ٠٠٥. ٪ ويخزن المحلول علي درجة حرارة – ٤٠ درجة مئوية أو اقل إن أمكن .

ويجب أخذ الحيطة والحذر اللازم لمنع التلوث أو التغير الكيماوي للعينة سواء قبل أو أثناء الاستخلاص ولاجراء ذلك يتبع الاتي :

لمنع التلوث بالشوائب to avoid contamination

١ – يجب تقطير كل المذيبات قبل الاستعمال .

٢ – يجب غسل جميع الاواني الزجاجية قبل الاستخدام مباشرة بالمخلوط كلوروفورم – ميثانول بنسبة ٢ : ١ ، حجم / حجم .

٣ – تجنب ملامسة العينة مع أي من المطاط أو البلاستيك وإستخدام سدادات من التفلون .

٤ – يجب أن تحفظ العينة في أوعية من الزجاج ذات غطاء من الزجاج أو التفلون ونفس الاجراء يجري علي المذيبات .

لمنع أكسدة الاحماض عديدة التشبع

to prevent oxidation of poly unsaturated acids.

١ – تتم كل عمليات التحليل في جو غني من النيتروجين .

٢ – طرد الاكسجين من المذيبات عن طريق إمرار غاز النيتروجين خلال المذيب .

٣ – تبخير المذيبات تحت درجة حرارة أقل من ٤٠ درجة مئوية وتحت ضغط منخفض .

٤ – إضافة مادة مضادة للاكسدة بتركيز ٠٠٥ر٪ (وزن / حجم) لمحلول العينة المخزنة ويجب

الاهتمام باختيار هذه المادة " المضاده للاكسدة " وذلك حتي لا يحدث لها تداخل مع عمليات التحليل الكروماتوجرافي وغالبا ما يستخدم BHT لانها لا تتداخل مع الأحماض الدهنية قصيرة أو طويلة السلسلة حيث أن الـ Peak الخاص بالـ BHT يظهر قريب من أو مع الـ Peak الخاص بالمذيب وذلك عند تحليل إسترات الميثايل للأحماض الدهنية بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي .

٥ - تجنب تعريض العينة للهواء لتقليل فرص حدوث عمليات الاكسدة الذاتية ولحماية المركبات الحساسة للضوء مثل الكينونات .

٦ - تخزين العينات في صورة محلول وفي جو غني بالنيتروجين وعلي درجة حرارة الصفر المئوي أو أقل .

لمنع حدوث التغير الكيماوي to avoid chemical alteration

١ - يجب أن يتم الاستخلاص لليبيدات مباشرة بعد قطع النسيج والهرس .

٢ - تجنب إطالة ملامسة العينات للكحولات خاصة في وجود وسط حامضي أو قلوي لمنع حدوث عملية تبادل تكوين الاستر .

التعرف على نوعية الزيت أو الدهن

Identification

يعتمد التعرف على الدهن أو الزيت على بعض إختبارات معينة متخصصه Specific كذلك تركيب الاحماض الدهنية والخصائص الطبيعية والكيماوية . ويتم غالبا التعرف على الزيوت الخام أو المكررة بتقدير ثوابت الدهن Fat constants مثل رقم التصبن – الرقم اليودى – نقطة تيتر Titer .. الخ ثم تقارن النتائج المتحصل عليها مع قيم الزيوت النقية المعروفه .

ومع ذلك فهناك تداخل كبير Over lapping لقيم العينات المعروفة وعليه فان المقارنة لوحدها لا تعطى دائما نتائج مؤكدة للتعرف على الزيوت . يستخدم تركيب الاحماض الدهنية وكذلك وجود مكونات معينة توجد بنسبة قليلة فى الجزء الغير متصبن من الليبيدات عادة فى تقسيم الزيوت والدهون ولكن بعض هذه المواد قد تتغير بدرجات متفاوته أثناء التصنيع Processing .

وعلى ذلك تستخدم الاختبارات المتخصصه فى الغالبية العظمى من الزيوت أو الدهون الغير مصنعه للتعرف عليها – من ذلك يتضح أن مشكلة التعرف ليست عملية سهلة نظرا لان التصنيع والخلط Mixing ينتج مركبات يناوىء Defy التعرف على الزيوت .

وبصفة عامة يعتمد التعرف على الزيت أو الدهن على ما يلى :

١ – تقدير الثوابت الطبيعية والكيماوية للزيت أو الدهن .

٢ – الاختبارات الخاصة المميزة للزيوت والدهون .

٣ – تركيب الاحماض الدهنية والمواد غير المتصبنة .

ويجب قبل اجراء التجارب العملية يجري تجهيز عينات الزيوت والدهون كما يلي : -

طريقة تجهيز العينات

أ - العينات السائلة الرائقة

تمزج العينة جيدا بان يقلب الوعاء المحتوي عليها عدة مرات حتي تتجانس العينه .

ب - العينات السائلة العكره أو المحتويه علي راسب

١ - يقلب الوعاء المحتوي علي العينة عدة مرات إلي أن ينفصل الراسب إنفصالا تاما عن جدران الوعاء ويتوزع توزيعا منتظما في الزيت .

٢ - يوضع الوعاء المحتوي علي العينه في الفرن علي درجة ٥٠ْم وتترك العينه حتي تصل إلي درجة حرارة الفرن ثم تمزج جيدا وترشح داخل الفرن عند درجة ٥٠ْم ويجب أن يكون الراشح رائقا تماما .

جـ - العينات الصلبة :

تصهر العينه بوضعها في الفرن عند درجة حرارة تزيد بمقدار ١٠ْم علي درجة انصهار الدهن وترشح داخل الفرن عند درجة ٥٠ْم .

د - العينات التي تتأثر فيها النتائج بوجود رطوبة

يجب تجفيف العينة قبل إجراء الاختبار باضافة كبريتات صوديوم لا مائية بنسبة ١-٢ جم/ ١٠ جم زيت أو دهن بعد تسخينها علي درجة ٥٠ْم داخل الفرن وتقلب جيدا ثم ترشح .

أولا : الخصائص الطبيعية والكيماوية Physical and chemical characteristics لبعض الدهون والزيوت (جدول ٢)

الزيت أو الدهن		الرقم اليودى	رقم التصبن	تتر (م)	معامل الانكسار (٢٥م)
الخروع	Castor	٩١ - ٨١	١٨٦ - ١٧٦	-	١٫٤٧٧ - ١٫٤٧٣
زيت جوز الهند	Coconut	١٠٫٥ - ٧٫٥	٢٦٤ - ٢٥٠	٢٤ - ٢٠	١٫٤٥٠ - ١٫٤٤٨ (٤٠م)
الذرة	Corn	١٢٨ - ١٠٣	١٩٣ - ١٨٧	٢٠ - ١٤	١.٤٧٤ - ١.٤٧٠
القطن	Cotton seed	١١٣ - ٩٩	١٩٨ - ١٨٩	٣٧ - ٣٠	١.٤٧٢ - ١.٤٦٣
الكابوك	Kapok	١١٠ - ٨٦	١٩٧ - ١٨٩	٣٢ - ٢٧	١.٣٧٣ - ١.٤٦٨
الكتان	Linseed	٢٠٤ - ١٧٠	١٩٦ - ١٨٨	٢١ - ١٩	١.٤٨٢ - ١.٤٧٧
الزيتون	Olive	٨٨ - ٨٠	١٩٦ - ١٨٨	٢٦ - ١٧	١.٤٦٨ - ١.٤٦٦
النخيل	Palm	٥٤ - ٤٤	٢٠٥ - ١٩٥	٤٧ - ٤٠	١.٤٥٦ - ١.٤٥٣
لب النخيل	Palm Kernel	٢٣ - ١٤	٢٢٥ - ٢٤٥	٢٨ - ٢٠	١.٤٥٢ - ١.٤٤٩
فول سودانى	Peanut	١٠٠ - ٨٤	١٩٥ - ١٨٨	٣٢ - ٢٦	١.٤٧٠ - ١.٤٦٦
	Perilla	٢٠٨ - ١٩٣	١٩٧ - ١٨٨	-	١.٤٨٢ - ١٫٤٨٠
الشلجم	Rapeseed	١٠٨ - ٩٧	١٨٠ - ١٧٠	١٥ - ١١	١.٤٦٨ - ١.٤٦٤
القرطم	Safflower	١٥٠ - ١٤٠	١٩٤ - ١٨٨	-	١.٤٧٦ - ١.٤٧٣
السمسم	Sesame	١١٦ - ١٠٣	١٩٤ - ١٨٨	٢٥ - ٢٠	١.٤٧٤ - ١.٤٧٠
فول الصويا	Soy bean	١٤١ - ١٢٠	١٩٥ - ١٨٩	٢٣ - ٢١	١.٤٧٥ - ١.٤٧١
عباد الشمس	Sun flower	١٣٦ - ١٢٥	١٩٤ - ١٨٨	٢٠ - ١٦	١.٤٧٥ - ١.٤٧١
الشاى	Tea seed	٩٠ - ٨٠	١٩٦ - ١٨٨	١٨ - ١٣	١.٤٦٩ - ١.٤٦٦
التانج	Tung	١٧٥ - ١٦٠	١٩٥ - ١٨٩	-	١٫٥٢٠ - ١.٥١٦
دهن لبن	Butter fat	٤٢ - ٢٦	٢٣٣ - ٢١٠	٣٨ - ٣٣	١٫٤٥٦ - ١٫٤٥٣ (٤٠م)
دهن دجاج	Chicken	٧٦ - ٦٤	٢٠٤ - ١٩٤	-	١٫٤٦٠ - ١٫٤٥٢
خنزير	Lard	٧٧ - ٥٢	٢٠٢ - ١٩٠	٤٣ - ٣٢	١٫٤٦١ - ١٫٤٥٩
دهن بقر	Tallow - beef	٤٨ - ٤٠	١٩٩ - ١٩٠	٤٧ - ٤٠	١٫٤٥٨ - ١.٤٥٠ (٤٠م)
دهن غنم	Tallow - Mutton	٤٦ - ٣٥	١٩٧ - ١٩٢	٤٨ - ٤٣	-
اللوز	Almond	١٠٢ - ٩٥	١٩٦ - ١٨٨	-	١.٤٧٣ - ١٫٤٧٠
المشمش	Apricot	١١٠ - ٩٨	١٩٣ - ١٨٨	-	١٫٤٧٢٥ - ١٫٤٧١٥
الخوخ	Peach	١٠٥ - ٩٣	١٩٢ - ١٨٩	-	١.٤٦٥٠ - ١٫٤٦٤٠

نقطة الانصهار Melting point

تستخدم نقطة الانصهار لتقييم المركبات النقيه حيث تنصهر إنصهارا كاملا – وفى حالة الزيوت والدهون فإن الوضع يختلف تماما لأنها تتكون من مخاليط من إسترات الجلسريدات الثلاثية والتى تختلف فى مقدار عدم تشبعها وأن حقيقة الامر هو أن الجلسريدات المشبعه تنصهر فى الجلسريدات غير المشبعه وقد يستخدم لفظ نقطة الذوبان Solubility point بدلا من نقطة الانصهار .

والطريقة الشائعة لتقدير نقطة الانصهار هى وضع عينه من الدهن فى أنبوبة شعريه ذات نهاية مغلقة ثم تحفظ فى مبرد لعدة ساعات على درجة حرارة ٥ – ١٠مْ حتى تتجمد تماما – تخرج الانبوبه من المبرد وتسخن ببطء فى حمام مائى حتى يصبح الدهن رائقا تماما وتسجل درجة الحرارة عند هذه الحالة .

معامل الانكسار Refractive index

تختلف قوة الانكسار لليبيدات بدرجة واضحة وهى تعتمد بدرجة كبيرة على مقدار عدم التشبع . فالاحماض الدهنية عالية عدم التشبع لها معامل إنكسار كبير – وعلى ذلك فان معامل الانكسار خاصية طبيعية تستخدم للتمييز بين أقسام الليبيدات المختلفة وهى أيضا مهمه فى تحليل الزبد . ويقدر معامل الانكسار عند درجة ٤٠مْ للزيوت والدهون – وتبعا للمواصفات القياسيه الانجليزية فانه يقدر معامل الانكسار على درجة ٢٠ْم فى حالة الزيوت ، ٤٠ْ م فى حالة الدهون الصلبه . ويلاحظ أن رفع درجة الحرارة تقلل من قيمة معامل الانكسار وترتفع القيمه بخفض درجة الحرارة .

ويستخدم جهاز Abbe refractometer فى القياس حيث يمكن قراءة معامل الانكسار مباشرة عند وضع فيلم رقيق من سائل بين منشورين مصنوعينْ من الزجاج .

تركيب الجهاز

يتكون الجهاز من منشورين يوضع بينهما الزيت وتسخن بواسطة ماء ساخن وتتحرك على المحور الافقى ومقياس معامل الانكسار محفور على قطعة من المعدن على هيئة Sector الذى يتصل بتلسكوب . وعند ضبط العدسه العينيه المتصله بالتلسكوب فانه يظهر المجال الذى به خطين على هيئة علامه × .

وعند ضبط الجهاز فان المجال ينقسم إلى قسمين أحدهما للضوء والآخر للظل Shadow ويمكن زيادة مساحة قسم عن الأخر بواسطة مفتاح مركب على الجهة اليسرى للقائم بالقياس .

والخط الفاصل بين الضوء والظل يمكن رفعه لاعلى أو لاسفل على حسب رغبة القائم بالتحليل – ويظهر هذا الخط ملون خلال الضوء والذى ينكسر علويا Upwords خلال المنشور بواسطة مرآة عن طريق المواد الملونه أو فيلم السائل بين المنشورين – فاذا كان الخط ملونا فانه يجب إرجاعه مرة اخرى الى لون أبيض أو رمادى بتحريك مفتاح آخر باحتراس على يمين القائم بالقياس . وتحت هذه الظروف ووجود الفيلم على المنشور ذو درجة الحرارة المطلوبه فان الخط الفاصل يتحرك إلى أعلى أو أسفل حتى يمر بنقطة التقاطع للخطوط الرفيعة على شكل × فى التلسكوب . وعند هذا الموضع تقرأ قيمة معامل الانكسار من على الـ Sector وتضبط حرارة المنشورين إلى درجة الحرارة المطلوبة (٤٠ْ م أو ٢٠ْ م) بواسطة إمرار تيار من الماء الساخن لفترة مناسبة للتأكد من الحصول على درجة الحرارة المطلوبة .

الطريقة :

١ – يفتح المنشور المتحرك ويوضع ١ – ٢ نقطة من الزيت أو الدهن على سطح المنشور الثابت يجب مراعاة عدم خدش أسطح المنشور ثم يغلق المنشور المتحرك .

٢ – يمرر تيار من الماء الساخن عن طريق حمام مائى حول المنشورين ويترك الزيت أو الدهن لفترة ٢ – ٣ دقائق حتى يأخذ درجة حرارة الماء الساخن .

٣ – يضبط مصدر الضوء ليضىء المجال البصرى عن طريق الذراع المتحرك للمنشورين حتى تظهر بوضوح الخطوط الرفيعة التى تحدد الخط الفاصل ثم يقرأ معامل الانكسار .

٤ – للحصول على تقديرات مضبوطة يفضل استخدام ضوء أحادى الموجات Monochromatic light ويعتبر ضوء الصوديوم الاصفر الذى له طول موجه ٥٨٩ مانومتر أكثر ملائمة – وإنه يمكن إستخدام الضوء العادى إلا أنه يصعب تحديد الخط الفاصل بين الجزء المظلم والمضىء للمجال .

طريقة الحساب :

١ – فى حالة إستخدام درجة حرارة أقل t_1 من درجة الحرارة القياسيه t تستخدم المعادلة التالية :

$$\eta t = \eta t_1 - (t - t_1) F$$

٢ - فى حالة إستخدام درجة حرارة t_1 أعلى من درجة الحرارة القياسية t تستخدم المعادلة التالى .

$$\eta t = \eta t_1 + (t_1 - t) F$$

حيث أن t = معامل الانكسار عند درجة ٢٠ْم

t = معامل الانكسار عند اى درجة حرارة .

F = معامل وهو يساوى ٠.٠٠٠٣٥ فى حالة الزيوت .

نقطة التعكير Turbidity point

تقدر درجة التعكير بتسخين الزيت مذابا فى مذيب مثل حامض الخليك أو كحول وفى معظم الحالات تنوب الزيوت فقط عند درجات الحرارة العالية - وعلى ذلك تسخن الزيوت حتى نحصل على مخلوط رائق ثم يسمح بالتبريد البطىء حتى تظهر عكارة دائمة نتيجة لانفصال الزيت وعند هذه الحالة تسجل درجة الحرارة والتى تعرف باسم نقطة التعكير .

الجواهر الكشافه :

١ - زيت لوز منخفض فى درجة الحموضة .

٢ - مخلوط كحولى .

يحضر مخلوط كحولى من حجوم متساوية من كحول إيثايل (٩٢٪) وكحول أمايل ثم يضاف ماء إلى المخلوط الكحولى ليعطى عكارة عند ٧٠ْم - ويلاحظ أن كمية الماء التى تضاف هى حوالى ١١ر٪ لكل درجة حرارة لاعطاء نقطه التعكير .

٣ - تحضير الزيوت

أ - يضاف ٢ جم كبريتات صوديوم لامائية الى ٢٥ - ٣٠ سم³ عينة زيت .

ب - يرج ثم تترك العينه لمدة ١/٢ ساعة ويرشح من خلال ورقة ترشيح عديدة الثنيات للحصول على مترشح رائق .

جـ - يقدر للزيت رقم الحموضة باستخدام وزنه ٥ - ١٠ جم .

الاجهزة : -

١ - ترمومتر قياسى .

٢ - أنابيب إختبار .

١٢.٥ × ١.٣ سم٣ ومدرجة الى ٢ ، ٤ سم٣ من قاع الأنبوبة بواسطة قلم ماس Diamond

٣ - محركات زجاجية .

٤ - كاسات سعة ٤٠٠ سم٣ .

طريقة العمل : -

١ - يسخن جزء من العينه الجافه فى أنبوبة اختبار بوضعها فى كأس مملوء لمنتصفه بماء مغلى لمدة ٥ دقائق .

٢ - يوضع ٢ سم٣ من العينة فى أنبوبة إختبار المدرجة ثم يضاف الخليط الكحولى حتى ٤ سم٣ .

٣ - تعلق الانبوبة فى كأس آخر يحتوى على ٢٠٠ سم٣ ماء ساخن .

٤ - يسخن الكأس تدريجيا مع التحريك حتى يصبح الخليط فى الانبوبة رائقا .

٥ - يلاحظ درجة حرارة الترمومتر ويستمر التسخين حتى تصبح ٥°م فوق درجة الحرارة التى أدت إلى تكوين خليط رائق .

٦ - يرفع المحرك ويمنع التخسين ويترك الماء فى الكأس لتبرد .

٧ - تسجل درجة الحرارة التى تبدأ عندها ظهور العكارة .

٨ - يكرر هذا الاختبار باستعمال عينة زيت جديده ومخلوط كحولى - ويجب أن لا يزيد الفرق فى درجة الحرارة عن نصف درجة للتجربتين لعينة الزيت .

تتر Tetre

تعرف تتر لزيت أو دهن بأنه نقطة التصلب Solidifying point لخليط الاحماض الدهنية وتعتبر درجة حرارة تتر ذات قيمه فى التعرف على الزيوت والدهون وقياس مدى التقسيمه Hardness وفى هذه الطريقة تجرى عملية تصبن للزيوت ثم التحميض ثم يسمح بتبريد

الاحماض الدهنيه وعندما يبدأ الصلب فى الإنفصال ترتفع درجة الحرارة قليلا وهذا راجع إلى إنطلاق الحرارة الكامنه ثم تصل درجة الحرارة الى درجة عالية وهى ما يطلق عليها تتر .

طريقة العمل

١ - يسخن ١٩ - ٢٠ جم بوتاسا كاوية صلبه مع ٧٠ سم٣ جلسرول فى كأس معته ٤٠٠ سم٣ حتى تصل درجة الحرارة الى ١٥٠° م وفى أثناء تسخين السائل يقلب تدريجيا ثم يضاف ٥٠ سم٣ من الدهن المنصهر وتظل درجة الحرارة ١٤٥ - ١٥٠°م لمدة ١٥ دقيقه مع التقليب أثناء التسخين .

٢ - يبرد المحلول جزئيا ثم يصب فى كأس يحتوى على ٤٥٠ سم٣ ماء ساخن ثم يغسل المتبقى بواسطة ٥٠ سم٣ أو أكثر من ماء ساخن .

٣ - يضاف ٥٠ سم٣ حامض كبريتيك مخفف (١ حجم مركز + ٣ حجوم ماء) ثم يغلى حتى تنصهر طبقة الاحماض الدهنية العلوية وتصبح رائقة - ثم تهمل الطبقة المائيه - يضاف ٢٠٠ سم٣ ماء ساخن إلى الدورق ثم يهمل الماء وتكرر عملية الغسيل مرتين .

٤ - تنقل الاحماض الدهنية باحتراس على ورقه ترشيح ثم توضع فى دورق داخل فرن مسخن على درجة ١٠٠°م لمدة نصف ساعة - ثم تنقل الاحماض الدهنية إلى انبوبة إختبار كبيرة (٩ سم × ٣ سم) .

٥ - يعلق ترمومتر رأسيا وفى منتصف الانبوبة - يسمح للسائل داخل الانبوبة بان يبرد وعندما يبدأ فى التجمد يقلب بواسطة الترمومتر وأن التقليب يكون عدة مرات من الشمال الى اليمين ثم من اليمين الى الشمال - ثم يحرك بسرعة بواسطة مقلب بحيث لا يلمس جدار الانبوبة - يلاحظ إنخفاض فى درجة الحرارة فى البداية ثم تظل ثابته ثم ترتفع قبل أن تنخفض مرة ثانية .

٦ - ورقم تتر هو أعلى درجة بعد أن تظل درجة الحرارة ثابتة .

٧ - يعاد صهر الاحماض الدهنية ويعاد التقدير مرتين متتاليتين بحيث يكون هناك تطابق بين التقديرين المتتاليين وأن الفرق فى درجة الحرارة بينهما ٢ر٠°م .

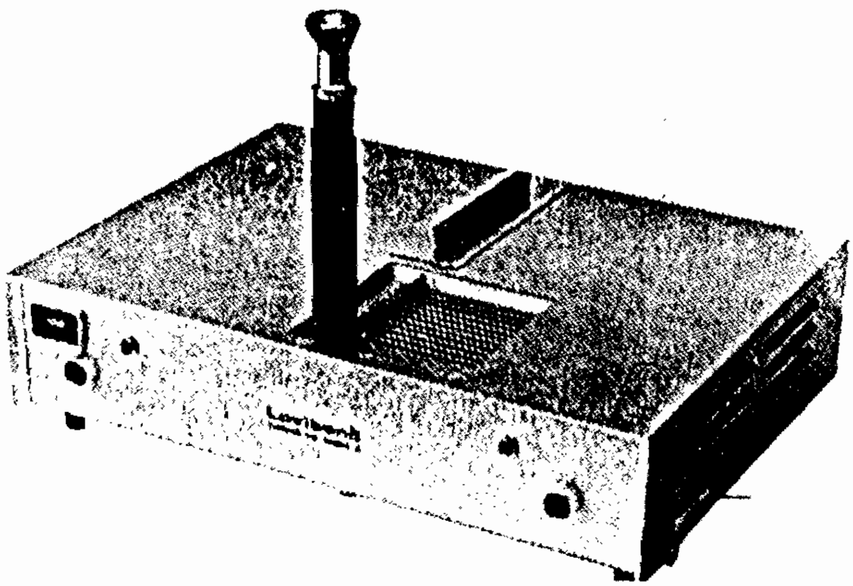
٨ - أرقام التتر لبعض الزيوت كما يلى : -

زيت فول سودانى ٣٠°م، زيت بذرة قطن ٣٣°م، زيت زيتون ٢٣°م، زيت بذرة الشاى ١٤° م.

اللون Colour

يعتبر قياس لون الزيت مؤشرا لجودته – ويتميز كل نوع من الزيوت بلون نوعى – وتوجد صبغات معينه فى زيوت تنفرد بها عن الزيوت الاخرى – ويلاحظ أن الوان هذه الزيوت تتأثر بعملية قصر اللون Bleaching – وكقاعدة عامة يفضل المستهلك سمن صناعى أبيض وزيوت ناصعه صفراء اللون الا فى حالة زيت الزيتون فلونه أخضر – ويرجع اللون الداكن للزيت الى أن الزيت الخام الذى صنع منه هذا الزيت ردىء الدرجة وأنه لم يكن قابلا للتبييض أو لقلة مادة التبييض – أو قد يتخلف من عملية التبييض الضعيفة صموغ وفوسفوليبيدات حيث تكسب الزيت لون قاتم أثناء عملية إزالة الرائحة . وكذلك عند إصابة البنور الزيتيه ببعض الفطريات أثناء التخزين (Farag et al, 1981) .

إن لون الزيت له أهمية كبيرة من الناحية التجارية حيث يفضل أن يكون لون الزيت الخام أصفر فاتح وتوجد وحدات units لتقدير اللون باستخدام جهاز Lovibond tintometer وهذه الوحدات عبارة عن مجموعة من زجاج ملون قياسى أو كمرجع وعلى أساسها تقارن لون الزيوت ويتكون مقياس اللون من ثلاثة أنواع من الزجاج وهى الاحمر – الاصفر – الازرق . وعادة تستخدم أرقام مناسبة من الزجاج الملون الاحمر والاصفر عند مقارنة لون الزيت – وأرقام وحدات الزجاج القياسى الملون الاحمر والاصفر هى :



جهاز اللوفيبوند

٠.١	٠.٢	٠.٣	٠.٤	٠.٥	٠.٦	٠.٧	٠.٨	٠.٩
١	٢	٢.٥	٣	٣.٥	٤	٥	٦	٧
٧.٦	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٦	٢٠	

ويقارن مدى عمق لون الزيت عادة باستخدام الزجاج القياسى للمجاميع الثلاثة ويبدأ القياس باللون الاحمر ثم الاصفر ويليه الازرق أى تحتاج إلى توليفة من الزجاج القياسى لتقدير لون الزيت ويلاحظ أن القيم المذكوره تتدرج فى عمق اللون وأن قيمتها إضافية فمثلا يمكن الحصول على أربعة وحدات من اللون الأحمر باستخدام زجاج أحمر وحدته واحد أو استخدام نوعين من زجاج أحمر وحدة كل منها $\frac{1}{2}$ وهكذا . والجهاز المستخدم اللوڤيبوند Lovibond tintometer يتكون من عدسة عينية مركبه فوق أنبوبة التى توضع بدورها فى مكان يحتوى على الزجاج الملون – وتحمل النهاية السفلية من الانبوبة مرآتان مثبتتان على زاوية ٤٥ درجة لتعكس الضوء الى أنبوبه النظر من كلا من لون الزيت المراد قياسه ولون الزجاج القياسى وكلا اللونيين يظهرا بجانب بعضهما ويفصلهما خط شعرى – ويتحرك الزجاج الملون القياسى فى مقدمة نصف مجال الرؤية ويظهر للزيت المراد معرفة لونه فى النصف الاخر من المجال وعند تساوى الكثافة اللونية لكليهما فانه يمكن معرفة درجة لون الزيت من الوحدات على الزجاج الملون، ويدرج الزيت فى الاسواق الى أرقام ١ ، ٢ ، ٣ على حسب درجة التكرير عن طريق الحكم باللون .

وعادة يقارن لون الزيوت بجهاز Lovibond tintometer باستخدام خليه ١ بوصه أو ١/٤ ٥ بوصه – وتوجد طريقة بديلة تعتمد على قياس الامتصاص باستخدام جهاز الاسبكتروفوتومترمع رابع كلوريد الكربون كمذيب فى خلية البلانك (٠.٥ – ٥ سم٢) عند طول الموجه التى يحدث عندها أقصى إمتصاص .

وفى بعض الزيوت التى تحتوى على الصبغة الخضراء النباتية (الكلوروفيل) فانه يمكن قياس الوانها عن طريق تقدير الامتصاص عند الاطوال الموجيه ٦٣٠ ، ٦٧٠ ، ٧١٠ نانومتر ويعبر عن الناتج بجزء فى المليون من الكلوروفيل .

عند إجراء التقدير يجب صهر الدهون وفى حالة الزيوت أو الدهون الغير شفافه Cloudy فيجب ترشيحها عند درجة حرارة لا تزيد عن ٦٠°م – وعند القياس يجب أن تكون درجة حرارة العينة مطابقة لدرجة حرارة المعمل أو لا تزيد عن ١٠°م فوق درجة الانصهار .

التعريف Definition

يقدر لون الزيت أو الدهن عن طريق المقارنه بزجاج له خواص معينه .

المدى التطبيقى Scope

يستخدم لكل أنواع الزيوت والدهون العادية بشرط أن تخلو العينة من العكارة .

الطريقة Method

١ - يجب أن تكون العينه رائقة تماما وفى حالة وجود عكارة لا بد من الترشيح .

٢ - تنظف أنبوبة القياس المطلوبة بمحلول رابع كلوريد الكربون وتجفف .

٣ - تملأ أنبوبة القياس (١ أو $\frac{١}{٤}$ ٥ بوصه) بالعينه حتى العلامة - تضبط درجة الحرارة (٢٢ ± ٢°م) فى حالة ما إذا كانت العينه غير سائلة تماما على درجة ٢٢°م فانه ترفع درجة الحرارة بحيث لا تزيد عن ١٠°م فوق درجة الانصهار الكاملة للعينه .

٤ - توضع أنبوبة القياس المحتوية على العينة فى الموضع المخصص لها فى جهاز اللوفيبوند وتوضع فى الجانب الآخر الشرائح الزجاجية القياسية اللازمه لمضاهاة لون العينه .

٥ - يعبر عن لون الزيت بوحدات اللوفيبوند أصفر وأحمر كما يلى : -

اللون مقاسا بأنبوبة القياس .... بوصة = مجموع شرائح اللون الاصفر + مجموع شرائح اللون الاحمر .

التحويل الضوئى Optical rotation

التعريف

التحويل النوعى أو قوة التحويل هو التحويل الزاوى لمستوى Angular rotation الضوء المستقطب بواسطة عمود سائل طوله ١٠ سم^{٢} .

ملاحظات عامه

١ - معظم الزيوت والدهون لها تحويل ضوئى قليل جدا ولكن زيت الخروع والزيوت التى تحتوى على حامض الشالموجريك لها معامل تحويل ضوئى عالى .

٢ - فى بعض الزيوت والدهون والتى تحتوى على كمية قليلة من الاستيرولات المختلفة تظهر معامل تحويل ضوئى واضح .

الجواهر الكشافه

كلوروفورم

الاجهزة

بولاريمتر Polarimeter

الطريقة

أولا : فى حالة الزيوت السائلة يوضع الزيت فى عمود ويحسب معامل التحويل الضوئى من المعادلة .

$$\propto = \frac{r}{l \times d}$$

حيث أن $\propto$ = معامل التحويل l = طول انبوبة القياس .

r = قراءة التحويل الضوئى .

d = كثافة السائل .

ثانيا : فى حالة المواد الصلبه مثل الدهون والاحماض الدهنيه تستخدم المعادله التاليه .

$$\propto = \frac{100.r}{lc}$$

حيث ان c = عدد جرامات الماده فى ١٠٠ سم^{3} محلول .

ويجب عند تقدير التحويل الضوئى ذكر اسم المذيب المستخدم وايضا درجة الحرارة التى تم عندها القياس .

$$\propto = D_1^{20}$$

تقدير الاحماض الدهنيه الحره

Free fatty acids (Acid value)

التعريف Definition

تقدر هذه الطريقه الأحماض الدهنيه الحره الموجوده فى العينه .

المجال Scope

تستخدم هذه الطريقة فى الزيوت الخام والمكرره وكذلك الدهون الحيوانيه .

ويستخدم هذا الرقم فى معرفة الى أى مدى للجلسريدات فى الزيت حدث لها تحلل تحت تاثير إنزيم الليباز وهذا التحلل يزداد بالحرارة والضوء وعادة يصاحب التزنخ تكوين احماض دهنيه حره ويعطى هذا التقدير بصفة عامه دليل على صلاحية الزيوت للاكل .

الادوات Apparatus

عينات الزيوت - دورق مخروط سعة ٢٥٠ سم٢ .

الجواهر الكشافه Reagents

١ - كحول إيثايل (٩٥٪) ويجب معادلة حموضته عن طريق إضافة دليل فينولفثالين والمعايره بواسطة قلوى حتى الحصول على لون وردى فاتح وذلك قبل إستخدامه مباشرة.

٢ - محلول دليل فينولفثالين (١٪ فى ٩٥ ٪ كحول) .

٣ - محلول صودا كاويه معروفه العياريه .

الطريقه Procedure

١ - يجب أن تكون العينه متجانسه وسائلة تماما قبل الوزن .

٢ - يستخدم الجدول (٣) كدليل فى أخذ وزنة العينة .

مدى تركيز الاحماض الحرة (٪)	وزن العينه (جم)	حجم الكحول (سم)	قوه القلوى
صفر - ٠.٢	٥٦.٤ ± ٠.٢	٥٠	٠.١ ع
٢ر - ١	٢٨.٢ ± ٠.٢	٥٠	٠.١ ع
١ - ٣٠	٧.٠٥ ± ٠.٠٥	٧٥	٠.٢٥ ع
٣٠ - ٥٠	٧.٠٥ ± ٠.٠٥	١٠٠	٠.٢٥ ع - ١ ع
٥٠ - ١٠٠	٣ر٥٢٥ ± ٠.٠٠١	١٠٠	١ ع

٣ – يضاف الحجم المخصص من الكحول الساخن والمتعادل ثم ٢ سم٣ من الدليل .

٤ – تعاير محتويات الدورق مع الرج الشديد حتى بداية ظهور لون وردى ويظل ثابتا لمدة ٣٠ ثانيه .

الحساب Calculation

تقدر النسبه المئوية للأحماض الدهنية الحره فى معظم حالات الدهون والزيوت على أساس حامض الاوليك – وفى حالات أخرى تنسب إلى الاحماض الدهنية الشائعة الانتشار فى العينه فمثلا تنسب النسبه المئوية للأحماض الدهنية الحره على أساس حامض اللوريك والبالميتيك لكل من جوز الهند Coconut وزيت النخيل Palm oil على التوالى .

$$\text{الاحماض الدهنية الحره على أساس حامض الاوليك (٪)} = \frac{\text{حجم القلوى (سم}^{٣}\text{)} \times \text{ع} \times ٢٨.٢}{\text{وزنه العينه}}$$

$$\text{الاحماض الدهنية محسوبة على أساس حامض اللوريك (٪)} = \frac{\text{حجم القلوى (سم}^{٣}\text{)} \times \text{ع} \times ٢٠}{\text{وزنه العينه}}$$

$$\text{الاحماض الدهنية محسوبة على أساس حامض البالميتيك (٪)} = \frac{\text{حجم القلوى (سم}^{٣}\text{)} \times \text{ع} \times ٢٥٫٦}{\text{وزنه العينه}}$$

وفى أغلب الاحوال يعبر عن الاحماض الدهنيه الحره بالاصطلاح رقم الحموضة بدلا من النسبه المئوية للأحماض الدهنية الحرة . ويعرف رقم الحموضه بانه عدد ملليجرامات البوتاسا الكاويه اللازمه لمعادله الاحماض الدهنية الحره فى ١ جم عينه . ولتحويل النسبه المئوية للأحماض الدهنيه الحره (محسوبه على أساس أوليك) إلى رقم الحموضه يضرب الرقم × ١.٩٩ .

ويمكن تقدير الاحماض الدهنية الحرة فى الزيوت النباتيه لونيا عن طريق رج مستخلص بنزين مع محلول خلات نحاس . حيث تتفاعل الاحماض الدهنيه مع أملاح النحاس وتعطى لون ازرق فى طبقه المذيب العضوى الذى يمكن قياسه عند طول موجه ٦٤٠ – ٦٩٠ nm ثم مقارنه النتائج باستعمال محاليل محتويه على كميات معروفه من حامض أوليك .

رقم التصبن Saponification number

التعريف Definition

هو عدد ملليجرامات البوتاسا الكاويه اللازمه لتصبن ١ جم من العينه .

يتكون الصابون Soap اثناء عملية التصبن فمثلا :

$$C_3H_5(C_{17}H_{35}COO)_3 + 3\,KOH \rightarrow C_3H_5(OH)_3 + C_{17}H_{35}COOK$$

Stearin glycerol Pot. stearate

وتحتاج إسترات الاحماض الدهنية ذات الوزن الجزىء المنخفض إلى كمية كبيرة من القلوى للتصبن وعلى ذلك توجد علاقه عكسية ما بين رقم التصبن ومتوسط الاوزان الجزئية للاحماض الدهنية فى الجلسريدات ، ولا يعتبر رقم التصبن له قيمه تشخيصيه فى التعرف على الزيوت بالمقارنه مع الرقم اليودى خاصة فى حالة الزيوت التى لها قيم متقاربه مثل مجموعة زيت الزيتون (رقم التصبن ١٨٨ - ١٩٦) - ويعتبر رقم التصبن له أهميه خاصة فى الكشف عن وجود زيت جوز الهند (رقم التصبن ٢٢٥) ، لب زيت النخيل (رقم التصبن ٢٤٧) ، دهن الزبد (رقم التصبن ٢٢٥) وهى التى تحتوى على نسبة عاليه من الاحماض الدهنية قصيرة السلسلة . ومن المعروف أن زيت البرافين يعطى نتيجة سالبه مع رقم التصبن وبالتالى يمكن الكشف عنه وتقدير كميته إذا وجد كمادة يغش بها .

الجوهر الكشاف Reagent

محلول بوتاسا كاويه كحوليه

أ - يوضع ٢ر١ لتر كحول فى دورق ويضاف اليه ١٠ جم بوتاسا كاويه + ٦ جم مسحوق أو ورق الومنيوم) ويسخن تحت مكثف عاكس لمدة نصف ساعة يقطر الكحول ويهمل ٥٠ سم٣ الأولى .

ب - يذاب ٤٠ جم بوتاسا كاويه فى اللتر من الكحول .

الطريقة Procedure

١ - يوزن بالضبط حوالى ٥ جم من العينه المتجانسه فى دورق مخروطى ٢٥٠ سم٣

٢ - يضاف بالماصة ٥٠ سم٣ محلول بوتاسا كاويه كحوليه إلى الدورق - ويجب أن يسمح بالتنقيط للجزء المتبقى من محلول البوتاسا الكاويه الكحوليه حتى وقت محدد .

٣ – يسخن الدورق بعد تركيب مكثف هوائى ويغلى محتويات الدورق حتى تمام عملية التصبن (نصف ساعة) .

٤ – يبرد الدورق وتعاير محتوياته بواسطة حامض HCl (٥ر٠ع) باستخدام دليل الفينولفيثالين.

٥ – يجرى عمل بلانك فى نفس الوقت مع العينه باستخدام نفس الماصة التى أضيف بها الجوهر الكشاف والتنقيط بنفس المده التى استخدمت فى العينه .

الحساب Calculation

$$\text{رقم التصبن} = \frac{(\text{أ} - \text{ب}) \times ٢٨,٠٥}{\text{وزن العينه (جم)}}$$

حيث :

أ = حجم الحامض بالسم٣ (٥ر٠ع) اللازم لمعايرة البلانك .

ب = حجم الحامض بالسم٣ (٥ر٠ع) اللازم لمعايرة العينة .

الرقم اليودى Iodine value

التعريف Definition

يدل الرقم اليودى على مقدار عدم التشبع للدهون والزيوت ويعبر عنه بعدد جرامات اليود التى تمتص بواسطة ١٠٠ جم عينه .

تطبيقاته Scope

يستخدم لجميع الدهون والزيوت الطبيعية التى لا تحتوى على نظام غير مشبع متبادل Conjugated ويرتبط اليود بكميات معينه من الجلسريدات التى تحتوى على أحماض دهنيه غير مشبعة وبالتالى فان الرقم اليودى هو مقياس لمقدار عدم التشبع- وهذا الرقم قيمة ثابته لزيت أو لدهن معين ولكن قيمة الرقم تعتمد بنوع خاص على الطريقة المستخدمه – ومن المعروف أن الزيوت تقسم إلى أقسام (دهون حيوانيه – زيوت غير قابلة للجفاف – زيوت نصف جافه – زيوت جافه) تبعا للرقم اليودى وعلى ذلك يستخدم هذا الرقم فى التعرف على المكان المناسب فى التقسيم المذكور الذى يوضع فيه الزيت والجدير بالذكر أن الدهون التى تحتوى على كمية قليلة من أحماض دهنية غير مشبعه ولها أرقام يوديه منخفضه تكون صلبه على درجة حرارة

الغرفه وعلى العكس فان الزيوت التى تحتوى على كمية كبيرة من أحماض دهنية غير مشبعه تكون سائله - وهذا يدل على وجود علاقة ما بين درجات الانصهار والارقام اليودية . وأيضا يجب التنويه بصفه عامه على أنه فى حالة إرتفاع مقدار عدم التشبع فان الزيت أو الدهن تزداد قابليته للتزنخ عن طريق الاكسدة .

وتعتبر طريقة الرقم اليودى وسيله إرشاديه لتتبع عملية الهدرجه . والجدير بالذكر أنه يوجد إرتباط بين قيمة الرقم اليودى ومتوسط عدد الروابط الزوجية فى عينة الزيت أو الدهن ولا توجد علاقة بين قيمة الرقم اليودى وتوزيع هذه الروابط الزوجيه بين الاحماض الدهنية غير المشبعة بالعينه وبذلك لا يمكن عن طريق الرقم اليودى معرفة نوعية الاحماض الدهنية غير المشبعة .

الأدوات Apparatus

١ - دوارق مخروطية بغطاء مصنفر (٥٠٠ سم^{٣}) .

٢ - دورق معيارى (١٠٠٠ سم^{٣})

٣ - ماصات (٢٠ سم - ٢٥ سم^{٣})

الجواهر الكشافة Reagents

١ - حامض خليك ثلجى نقى .

يجب عند تخفيف ٢ سم٣ من الحامض بواسطة ١٠ سم٣ ماء مقطر واضافة ١ , ٠سم٣ برمنجنات بوتاسيوم ١ , ٠ ع ألا يختفى اللون الوردى فى خلال ساعتان .

٢ - يوديد بوتاسيوم .

٣ - غاز الكلور .

يحضر باضافة حامض HCl (كثافتة ١.١٩) نقطه نقطه على برمنجنات بوتاسيوم أو على خليط من برمنجنات البوتاسيوم وثانى اكسيد المنجنيز - يمرر غاز الكلور المتصاعد خلال أنبوبة زجاجية تحتوى على حامض كبريتيك كثافته ١.٨٤ ثم خلال محلول اليود .

٤ - رابع كلوريد الكربون .

٥ - حامض هيدروكلوريك كثافه ١.١٩ .

٦ - نشا ذائب.

يحضر بعمل عجينة Paste من إضافة كمية قليله من ماء مقطر بارد الى ١ جم نشا .

يضاف ٢٠٠ سم٣ ماء يغلي مع التحريك - وللتأكد من حساسية محلول النشا يوضع ٥سم٣ من المحلول السابق تحضيره الي ١٠٠ سم٣ ماء ثم يضاف ٠٫٥ سم٣ محلول يود ٠.١ ع ويجب أن يختفي اللون الأزرق الغامق عند اضافة ٠.٠٥ سم٣ من محلول ثيوكبريتات الصوديوم ٠.١ ع .

٧ - ثاني كرومات البوتاسيوم .

يجب أن تكون مطحونه جيدا ومجففه علي درجة ١١٠ °م حتي ثبات الوزن قبل الاستخدام.

٨ - ثيوكبريتات الصوديوم .

٩ - يود .

١٠ - حامض كبريتيك كثافته ١٫٨٤ .

المحاليل Solutions

١ - محلول يوديد البوتاسيوم .

يذاب ١٥٠ جم في ماء مقطر ثم يكمل الحجم الي لتر .

٢ - محلول نشا .

تحضر عجينة متجانسة من ١٠ جم نشا ذائب في ماء مقطر بارد . ثم يضاف مع التحريك ١ لتر ماء مقطر يغلي ثم يبرد . يمكن إضافة حامض ساليسيليك (١.٢٥ جم / لتر) كمادة حافظة - واذا كان المطلوب حفظ محلول النشا لفترة طويلة فيجب وضعه في الثلاجه علي درجة حرارة ٤ - ١٠ °م - وفي حالة عدم تحديد نقطة نهاية التفاعل بالمعايره من تحول اللون من الازرق إلي عديم اللون يجب يحضر حديثا محلول النشا .

٣ - محلول قياسي من ثاني كرومات البوتاسيوم (٠.١ ع) .

يذاب ٤.٩٠٣٥ جم من ثاني كرومات البوتاسيوم الناعم والمجفف في ماء مقطر ثم يكمل الحجم الي لتر باستخدام دورق معياري .

٤ - محلول ثيوكبريتات الصوديوم (٠.١ ع) .

يذاب ٢٤.٨ جم ثيوكبريتات صوديوم في ماء مقطر ويكمل الحجم الي لتر - ولمعرفة قوة

محلول ثيوكبريتات الصوديوم يوضع ٢٥سم٣ من محلول ثاني كرومات البوتاسيوم في دورق مخروطي ثم يضاف ٥ سم٣ حامض HCl و ١٠ سم٣ محلول يوديد بوتاسيوم ثم ترج محتويات الدورق وتترك لمدة ٥ دقائق ويضاف ١٠٠ سم٣ ماء مقطر - يعاير بمحلول ثيوكبريتات الصوديوم مع الرج المستمر حتي يكاد أن يختفي اللون الأصفر - يضاف ١ - ٢ سم٣ محلول النشا ثم تكمل عملية المعايرة باضافة ببطءمن محلول الثيوكبريتات حتي يكاد يختفي اللون الازرق ثم تحسب عياريه محلول الثيوكبريتات .

عيارية محلول الثيوكبريتات = ٢.٥ ÷ حجم الثيوكبريتات المطلوب في المعايره (سم) .

٥ - محلول ويجز Wijs

يذاب ١٣ جم من اليود في واحد لتر حامض خليك ثلجي ويمكن التسخين البسيط لاسراع النوبان ثم التبريد - يؤخذ ١٠٠ - ٢٠٠ سم٣ من هذا المحلول البسيط لاستخدامه فيما بعد - يمرر تيار من غاز الكلور في محلول اليود الباقي حتي عند أخذ كمية منه ومعايرته بالثيوكبريتات يعطي نصف الحجم من الثيوكبريتات عند معايرة كمية مساويه له من محلول اليود الأصلي - يلاحظ ظهور لون مميز لمحلول اليود عند إمرار الكلور حتي الوقت اللازم للحصول علي محلول ويجز .

الطريقة Procedure

١ - تصهر العينه إذا كانت غير سائله تماما ثم ترشح خلال ورقه ترشيح للتخلص من الشوائب وآثار الرطوبه .

ملحوظه : يجب أن تكون العينات جافة تماما وجميع الزجاجيات نظيفة وجافة .

٢ - تؤخذ وزنه بالضبط من العينه في دورق ٥٠٠ سم٣ ذي غطاء مصنفر سبق إضافه إليه ٢٠ سم٣ من محلول رابع كلوريد الكربون - يجب أن تكون وزنه العينه مناسبه بحيث يجب أن تكون هناك كميه زائدة من محلول ويجز تعادل من ٥٠ - ٦٠٪ من الكمية المضافة أي ١٠٠ - ١٥٠٪ من الكمية الممتصه بواسطة العينه - والجدول (٤) عباره عن دليل لأخذ وزن العينه .

جدول(٤)

الرقم اليودي	وزنة العينة (جم) ١٠٠٪ زيادة من الجوهر	وزنة العينة (جم) ١٥٠٪ زيادة من الجوهر	دقة الوزن (جم)
أقل من ٣	١٠	١٠	٠,٠٠١
٣	٨,٥٧٦	٨,٤٦١٣	٠,٠٠٥
٥	٦,٤٣٦	٥ر٠٧٧٠	٠,٠٠٠٥
١٠	٣,١٧٣٠	٢,٥٣٨٤	٠,٠٠٠٢
٢٠	١,٥٨٦٥	٠,٨٤٦١	٠,٠٠٠٢
٤٠	٠,٧٩٣٥	٠,٦٣٤٦	٠,٠٠٠٢
٦٠	٠,٥٢٨٨	٠,٤٢٣١	٠,٠٠٠٢
٨٠	٠,٣٩٦٦	٠,٣١٧٣	٠,٠٠٠١
١٠٠	٠,٣١٧٣	٠,٢٥٣٨	٠,٠٠٠١
١٢٠	٠,٢٦٤٤	٠,٢١١٥	٠,٠٠٠١
١٤٠	٠,٢٢٦٦	٠,١٨١٣	٠,٠٠٠١
١٦٠	٠,١٩٨٣	٠,١٥٨٧	٠,٠٠٠١
١٨٠	٠,١٧٦٢	٠,١٤١٠	٠,٠٠٠١
٢٠٠	٠,١٥٨٦	٠,١٢٦٩	٠,٠٠٠١

٣ - يضاف ٢٥ سم^3 من محلول ويجز بالماصه إلي الدورق المحتوي علي العينه ثم ترج محتويات الدورق حركه مروحيه للتأكد من تمام المزج .

٤ - يجري عمل علي الأقل ٢ بلانك في نفس الوقت مع العينات .

٥ - تخزن الدوارق في مكان مظلم لمدة نصف ساعه علي درجة ٢٥°م ± ٥°م .

٦ - تخرج الدوارق من الظلام ويضاف ٢٠ سم٣ من محلول يوديد بوتاسيوم يتبعها إضافة ١٠٠ سم^3 ماء مقطر .

٧ - تعاير محتويات الدورق بواسطة محلول ثيوكبريتات الصوديوم علي أن تكون الاضافة تدريجية مع الرج الشديد . تستمر عملية المعايره حتي يكاد أن يختفي اللون الأصفر - يضاف ١ - ٢ سم٣ دليل النشا وتكمل عملية المعايره حتي إختفاء اللون الأزرق .

الحساب Calculation

$$\text{الرقم اليودي} = \frac{(\text{ب} - \text{أ}) \times \text{ع} \times ١٢.٦٩}{\text{وزن العينه}}$$

حيث :

ب = معايرة البلانك   أ = معايرة العينة

ع = عيارية محلول الثيوكبريتات .

يمكن معرفة الرقم اليودي بطريقة اخري وهي تعتمد علي معرفة نوعية وكمية الاحماض الدهنية بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي ثم إستخدام المعادلة التالية :-

الرقم اليودي = ١ (٪ للاحماض الدهنية أحادية عدم التشبع/١٠٠) + ٢ (٪للاحماض الدهنية ثنائية عدم التشبع/ ١٠٠) + ٣ (٪ للاحماض الدهنية ثلاثية عدم التشبع / ١٠٠)

رقم الايدروكسيل Hydroxyl value

التعريف Definition

يعرف رقم الايدروكسيل بانه عدد ملليجرامات البوتاسا الكاويه التي تكافيء المحتوي الايدروكسيلي في ١ جم عينه .

المجال Scope

تستخدم هذه الطريقة في الزيوت ومشتقاتها مثل الأحماض الكحوليه - الجلسريدات الأحادية والثنائية .

تجري عملية الاستلة بواسطة أندريد حامض الخليك في البيريدين ثم تحلل الكمية الزائدة من الاندريد بالغليان مع الماء وبعد الحصول علي محلول متجانس باضافة كحول بيوتايل عادي - تعاير الحموضه بواسطة صودا كاويه كحوليه . وتقدر كمية أندريد حامض الخليك اللازمه في عملية الاستله بان يجري التقدير بدون عينه - ويجري نفس التقدير باستعمال البيريدين بدون أندريد حامض الخليك لتعيين كميه الاحماض الدهنيه الحره في العينه .

الجواهر الكشافه Reagents

١ - بيريدين معاد تقطيره عند درجة ١١٤ - ١١٥ْم .

٢ - أندريد حامض الخليك .

٣ - الجوهر الكشاف بيريدين - أندريد حامض الخليك .

يحضر بخلط ٣ حجوم من البيريدين مع حجم واحد من أندريد حامض الخليك قبل الاستعمال مباشرة .

٤ - كحول البيوتايل : يجب معادلته بواسطة محلول بوتاسا كاويه ٠.٥ع في وجود دليل فينولفيثالين حتي اللون الوردي .

٥ - محلول قياس كحولي من البوتاسا الكاويه (٠.٥ ع) .

الطريقة Procedure

١ - يستخدم الجدول (٥) كدليل في أخذ وزنة العينه .

رقم الايدروكسيل	وزن العينه (جم)
صفر - ٢٠	١٠ ± ٠.١
٢٠ - ٥٠	٥
٥٠ - ١٠٠	٣
١٠٠ - ٢٠٠	٢

تؤخذ وزنة العينه (٩ - ١٠ جم) في دورق آخر لتقدير الحموضه .

٢ - يضاف بالماصه ٥ سم٣ من الجوهر الكشاف إلي دورق العينه التي تجري لها عمليه أسئلة Acetylation ففي حالة العينات التي لها أرقام إيدروكسيل في حدود صفر - ٢٠ يضاف كمية أخري من البيريدين (٥ سم٣) ثم تخلط مكونات الدورق بحركه مروحيه .

٣ - يضاف بالماصه ٥ سم٣ من الجوهر الكشاف إلي دورق آخر كبلانك للجواهر الكشافه.

٤ - توضع الدوارق داخل حمام مائى يغلي وتسخن تحت مكثف عاكس لمدة ساعة .

٥ - يضاف ١٠ سم٣ ماء من خلال المكثف وتسخن الدوارق مره أخري لمدة ١٠ دقائق .

٦ - تترك الدوارق لتبرد ثم تزال المكثفات ويضاف ٢٥ سم٣ من كحول البيوتايل العادي علي أن تضاف نصف الكميه من خلال المكثف قبل إزالته ثم تغسل فوهة وجوانب الدورق بالكميه الباقيه من الكحول .

٧ - يضاف ١ سم٣ من دليل الفينولفيثالين ثم تعاير محتويات الدورق حتي اللون الوردي باستخدام بوتاسا كاويه كحوليه (٥ر٠ ع) .

٨ - يضاف ١٠ سم٣ من البيريدين المتعادل إلي العينه التي يجري لها تقدير الحموضة - ثم ١سم٣ من دليل الفينولفيثالين وتعاير محتويات الدورق حتي اللون الوردي باستخدام بوتاسا كاويه كحوليه (٥ . ٠ ع) .

الحساب Calculation

$$\text{رقم الايدروكسيل} = \frac{\{ \text{أ} + (\text{ب} \times \frac{\text{جـ}}{\text{د}}) - \text{هـ} \} \times \text{ع} \times ٥٦.١}{\text{وزن العينه}}$$

حيث :

أ = حجم القلوي (سم٢) المستخدم لمعايرة الجوهر الكشاف .

ب - وزن العينة (جم) المستخدمة في عملية الأستلة .

جـ = حجم القلوي (سم٢) المستخدم في معايرة الحموضه .

د = وزن العينه (جم) المستخدم في تقدير الحموضه .

هـ = حجم القلوي اللازم في عملية الأستلة .

ثانيا : الخصائص المميزة التي تستخدم للتعرف علي زيوت ودهون معينه : -

جدول(٦)

الزيت أو الدهن	الخاصية المميزة Specific characteristic
زيت بذرة القطن Cottonseed	اختبار هالفن Halphen
زيت السمسم Sesame	اختبار ڤيلاڤيشيا Villavecchia
زيت الفول السوداني Peanut	اختبار بيللير Bellier
زيت بذر الشاي Teaseed	اختبار معدل للبيرمان – بيرخارد Libermann - Burchard
زيت كابوك Kapok	اختبار بسون Besson
زيت جوز الهند Coconut	رقم التصبن مرتفع مع إحتوائه علي حامض لوريك
الزيوت البحرية Marine	إرتفاع تركيز الاسكوالين – إختبار البروميد الغير ذائب
الزبد النباتي Vegetative butter	اختبارات البلوره .
زيت التانج Tung	يحتوي علي أحماض دهنيه غير مشبعه متبادله Conjugated
دهن اللبن Butter fat	تحتوي علي حامض بيوتريك وأحماض دهنية اخري ذات وزن جزئي منخفض
دهون حيوانية Animal fats	تحتوي علي كولستيرول
دهن البقر وزيوت نباتية مهدرجة في دهن الخنزير	اختبار بومر Boemer
زيوت نباتيه في دهون حيوانية أخري	تقدير درجة الانصهار للاستيرولات
زيت زيتون Olive	يحتوي علي إسكوالين .
زيت خروع . Castor	اختبارات الذوبان – إرتفاع اللزوجة – إرتفاع تركيز مجاميع الايدروكسيل .

الإختبارات الخاصة المميزه للزيوت

Special tests for individual oils

ا - الكشف عن زيت الفول السوداني Peanut (Arachis) oil

تعتمد طريقة الكشف عنه علي فصل حامض الاراشيديك Arachidic من الجلسريدات الموجوده في زيت الفول السوداني . ويعتمد إختبار بلبير Bellier لزيت الفول علي عدم النوبان النسبي لحامض الاراشيديك في ٧٠٪ كحول عند المقارنه بالاحماض إستياريك وباالميتيك .

طريقة العمل :

أ - يغلي ١ سم٣ من الزيت مع ٥ سم٣ بوتاسا كحولية ٥ر١ مول (٤١٦ر٨٪ بوتاسا كاويه في ٩٥٪ كحول) في دورق صغير تحت مكثف عاكس لمدة ١٠ دقائق .

ب - يضاف ٥٠ سم٣ كحول (٧٠٪ - حجم / حجم) و ٠.٨ سم٣ حامض هيدروكلوريك (كثافته ١.١٦) ثم يسخن لذوبان أي راسب يتكون .

جـ - يبرد مع الرج المستمر بواسطة ترمومتر في السائل بحيث تنخفض درجة الحرارة بمعدل ١°م/ دقيقة ثم تسجل درجة الحرارة التي عندها يبدأ ظهور العكارة .

د - أرقام العكاره Clouding Point للزيوت المختلفه هي :

زيت الفول السوداني ٣٩ - ٤٠°م	زيت الشلجم ٢٢.٥°م
زيت السمسم ١٥°م	زيت بذرة القطن ١٣°م
زيت الذرة ٧ - ١٤°م	زيت الزيتون ٦ - ٩°م
زيت الذرة ٧ - ١٤°م	زيت اللوز - ١°م الي + ١°م
زيت بذرة الشاي ٣ - ٩°م	
زيت المشمش - ٤°م الي - ٨°م	

٢ -- اختبار هالفن Halphen لزيت بذرة القطن Cottonseed :

جوهر كشاف هالفن :

تخلط حجوم متساوية من كحول أمايل ١٪ (وزن / حجم) مع محلول من كبريت مترسب في ثاني كبريتيد الكربون .

طرقة العمل :

أ - يمزج ٢.٥ سم ٣ من الزيت أو الدهن المنصهر مع ٢.٥ سم٣ من الجوهر الكشاف في زجاجة ذات غطاء له قلاووظ .

ب - يوضع الغطاء غير محكم القفل ويسخن علي حمام مائى يغلى لمدة ربع ساعه .

جـ - في حالة وجود ٢٪ أو أعلي من زيت بذرة القطن يتكون لون وردي نتيجة لوجود أحماض Cyclo - propenoid وأن الكثافه اللونيه للمحلول تتناسب طرديا مع كمية زيت بذرة القطن .

د - يلاحظ أن الكثافه اللونيه تقل عند التسخين علي درجة حرارة مرتفعه ولا يظهر لون في حالة الزيت الذي يسخن علي درجة ٢٢٥°م أو أعلي - كما أن عملية الهدرجة الكاملة أو الجزئية تكسر Destroy الاجسام الكروموجينيه معتمدا علي درجة المعاملة.

٣ - اختبار باودوين Baudouin لزيت السمسم Sesame :

أ - يرج ٢ سم٣ زيت أو دهن منصهر مع ١ سم٣ حامض هيدروكلوريك مركز المحتوي علي ١٪ (وزن / حجم) سكر سكروز ويترك جانبا لمدة ٥ دقائق .

ب - يظهر لون أحمر في الطبقة السفلية في حالة وجود ١٪ أو اكثر من زيت السمسم وذلك يرجع إلي وجود ماده السيساموليين Sesamoline(جليكوسيد) والسيسامين Sesamine (معقد من إثيرات حلقية) .

جـ - تعطي عديد من الزيوت لون بني مع هذا الاختبار - كما أن الزبده ودهن الخنزير الناتجه من حيوانات مغذاه علي كسب Cake السمسم تعطي لون قرمزي خفيف وهناك أنواع معينه من زيوت الزيتون الناتجه من شمال أفريقيا تعطي نتيجة إيجابيه مع الاختبار ولذلك يجري الاختبار التالي المعدل :

يرج ٥ سم ٣ زيت في دورق مع ٥ سم٣ مخلوط من ٩ : ١ (حجم / حجم) كحول إيثايل (٩٠٪ حجم / حجم) وأمونيا ٨٨ . ٠ ويسخن الخليط علي حمام مائى حتي يتم التخلص من الكحول والامونيا . ثم يجري إختبار باودوين علي الناتج ويلاحظ أن زيت الزيتون الحقيقي Genuine يعطي نتيجة سالبه مع الاختبار .

وهناك إختبار آخر للسمسم يسمي اختبار فيللافيشيا .

إختبار فيللافيشيا Villavecchia :

- يخلط ١٠ سم٣ زيت أو دهن سائل مع حجم مساو من حامض هيدروكلوريك مركز في أنبوبة إختبار .
- يضاف ١ . ٠ سم٣ من مخلوط يتكون من ٢ سم٣ فيرفيرال و ١٠٠ سم٣ كحول (٩٥٪).
- يرج جيدا لمدة ١٥ ثانية ويترك جانبا حتي ينكسر المستحلب ويلاحظ اللون المتكون في الطبقه السفليه بسرعه .
- في حالة عدم ظهور لون قرمزي في هذا الاختبار يكون سالبا أما إذا ظهر أي لون قرمزي في الطبقه السفليه يضاف ١٠ سم٣ ماء مقطر ويرج مرة ثانية ويلاحظ اللون بسرعة عند إنفصال الطبقات فاذا ظل اللون فهذا يدل علي عدم وجود زيت السمسم وإذا اختفي اللون فهذا يدل علي وجود زيت السمسم .
- ينطبق هذا التفاعل علي الزيوت المهدرجه وغير المهدرجة ولكن ليس بنفس درجة الحساسيه ويمكن أن تزداد حساسيه التفاعل بزيادة كمية الجوهر الكشاف إلي ١ سم٣ وهذا يؤدي إلي إسراع معدل تكوين اللون وكذلك إسراع تكوين كميات من الوان غير مميزة وبالتالي يجعل عملية المقارنه أكثر صعوبة .

٤ - اختبار فيتلسون Fitelson لزيت بذرة الشاي Teaseed :

أ - يخلط كل من ٨ . ٠ سم٣ أندريد حامض الخليك و ٥ . ١ سم٣ كلوروفورم و ٢ . ٠ سم٣ حامض كبريتيك مركز (كثافة ١.٨٢) في أنبوبة إختبار ثم يبرد في ماء مثلج .

ب - يضاف حوالي ٢٢ . ٠ جم (٧ نقط) من الزيت - يبرد مرة ثانية ويرج .

جـ - إذا كان السائل معكر Cloudy يضاف أندريد حامض الخليك نقطه نقطه مع الرج بعد كل إضافه حتي يصير السائل رائقا وتوضع الانبوبة في ماء مثلج لمدة ٥ دقائق.

د - يعطي زيت الشاي لون اخضر غامق من الضوء الساقط ولون بني من الضوء النافذ ويعطي زيت الزيتون لون أخضر في كلتا الحالتين .

هـ - عند إضافة ١٠ سم٣ إثير جاف مع الرج وقلب الانبوبة ثم إعادتها يعطي زيت بذرة الشاي لون بني الذي يتغير إلي اللون الاحمر في خلال دقيقه ثم يختفي - في حالة زيت الزيتون فانه يعطي في البداية لون أخضر الذي يتحول تدريجيا الي اللون البني - وهناك بعض أنواع من زيت الزيتون التونسي يعطي لون قرمزي فاتح كمرحله إنتقاليه .

والمركب المسئول عن إختبار فيتلسون يرجع إلي وجود تربين كحولي Butyro spermol.

٥ - اختبار بيبر Bieber للكشف عن زيت لب اللوز Kernel almond :

أ - يخلط اجزاء متساوية في الوزن باحتراس مع التبريد كلا من الماء وحامض كبريتيك مركز وحامض نيتريك مدخن (كثافه ١,٤٥) .

ب - يرج ٥ سم٣ من زيت اللوز بشده مع ١ سم٣ من مخلوط الاحماض وتترك لمدة ١٥ دقيقة في حالة وجود زيت المشمش أو الخوخ فان المخلوط المبيض Whitish المتكون يعطي لون قرمزي وزيت اللوز الحقيقي يعطي فقط لون بني خفيف .

٦ - الكشف عن زيت الشلجم Rape :

يعتمد إختبار تورتللي - فورتيني Tortelli & Fortini للكشف عن زيت الشلجم علي وجود حوالي ٥٠٪ حامض إيروسيك بالزيت - الملح الرصاصي لهذا الحامض غير المشبع يذوب جزئيا في الاثير في حين أن الملح الرصاص للاوليات تذوب بسهوله في الاثير .

طريقة العمل :

أ - تجري عملية تصبن باضافة ٥٠ سم٣ بوتاسا كحولية (١٢٪ بوتاسا في ٩٠٪ كحول الي ٢٠ جم زيت ثم التسخين تحت مكثف عاكس لمدة نصف ساعه - يعادل ناتج التصبن بواسطة ١٠٪ حامض خليك في وجود دليل فينولفيثالين .

ب - يصب Pour المحلول المتعادل إلي ٣٠٠ سم٣ ماء يغلي يحتوي علي ٢٠ جم خلات رصاص ثم يبرد المحلول مع الرج الدوراني بحيث يلصق الصابون علي جوانب الكأس - ثم يهمل السائل ويغسل الراسب الصابون الرصاصي ثلاث مرات كل مرة بـ ٢٠٠ سم٣ ماء ساخن (٦٠ - ٧٠ْ م) قبل التجفيف بواسطة ورقة ترشيح .

جـ - يرج الصابون الجاف مع ٨٥ سم٣ إثير ويغلي تحت مكثف عاكس لمدة نصف ساعه ثم يبرد الدورق ويقفل ويترك بالضبط لمدة ١ ساعه عند درجة ١٥ م .

د - يرشح المحلول إلي قمع فصل مع تغطيته لمنع الفقد عن طريق البخر - يعامل الراسب بواسطة ٤٠ سم٣ إثير ويبرد مرة أخري لمدة ١ ساعه ويرشح الي قمع الفصل.

هـ - تنفرد الأحماض الدهنية من مخلوط الاثير للصابون الرصاصي باضافة ١٥٠ سم٣ من ١٠٪ حامض هيدروكلوريك ثم تغسل طبقة الاثير مرتين كل مرة بواسطة ١٠٠ سم٣ من الماء - ثم يبخر الاثير عند درجة حرارة منخفضه (يفضل التبخير التلقائي) في دورق جاف .

و - تذاب الاحماض السائله في ٤٠ سم٣ من كحول ٩٥٪ ثم تضاف كمية زائدة قليلا من محلول مشبع لكربونات الصوديوم حتي تبدأ كربونات الصوديوم في الانفصال . يجري تقطير للكحول ويجفف الصابون الصوديومي المتبقي في مجفف تحت تفريغ لمدة ٤٨ ساعه - يسخن مع ٥٠ سم٣ كحول مطلق ثم يرشح بسرعة - يعامل المتبقي مرة أخري بالكحول المطلق حتي تنوب كل كمية الصابون - يبخر الصابون الكحولي ويجفف فوق حامض كبريتيك .

يذاب ٠,٥ جم من الصابون الجاف بالتسخين مع ٢٠ سم٣ كحول مطلق في أنبوبة إختبار كبيرة - ثم يبرد المحلول ببطء مع الرج باستعمال ترمومتر ثم تسجل درجة الحرارة التي عندها يصبح المحلول معكرا .

وفيما يلي درجات حرارة التعكير للزيوت المختلفة :

زيت زيتون ٢٤ - ٢٠°م

زيت فول سوداني ٢٢ - ١٨°م

زيت بذرة قطن ١٤ - ١٦°م

زيت سمسم ١٨ - ٢٠°م

زيت شلجم ٤٥ - ٥٠°م

ا - الكشف عن زيوت الاسماك Fish :

تستغل عدم ذوبان البروميدات للأحماض الدهنية عاليه عدم التشبع كوسيلة للكشف عن

زيت السمك غير المهدرج - وهذه الطريقة حساسة يمكن الكشف عن وجود زيت السمك في الزيوت والدهون النباتيه .

أ - اختبار هكسابروميد Hexabromide (Insoluble bromide test)

يذاب ٠.٥ سم٣ زيت في ١٠ سم٣ إثير جاف ثم يضاف ١٠ سم٣ من مخلوط مكون من ٢٨ حجم حمض خليك ثلجي - ١ حجم ماء بروم - ٤ حجم نيتروبنزين ثم يرج بشده ويترك علي درجة ٢٠°م لمدة ١٥ دقيقه .

ب - في حالة وجود فقط زيت شلجم أو زيوت نباتيه فان المحلول يظل رائقا ولكن في حالة زيت السمك أو زيوت قابلة للجفاف مثل الكتان فانه يظهر في الحال راسب من البروميدات غير الذائبة .

جـ - في حالة عدم نوبان الزيت في الاثير فان الزيوت الجافه أو زيوت الاسماك تعطي في الحال راسب - ويعطي زيت الشلجم وزيت فول الصويا عكارة وفي حالة الزيوت الغير قابلة للجفاف لا تعطي راسب أو تعطي عكارة خفيفه - تعطي الدهون الحيوانيه عكارة إذا أجري الاختبار بهذه الطريقة .

وفيما يلي خصائص المشتقات البروميه لبعض للاحماض الدهنية الغير مشبعة :

جدول(٧)

الحمض الدهنى	المشتق	النوبان	درجة الانصهار للبرميد (م)
الاوليك	ثنائى البروم	يذوب في الاثير والكلوروفورم والمذيبات العضوية الاخري .	سائل
لينوليك	رباعي البروم	كحول إيثايل Ditto	١١٣ - ١١٦°م
لينولينيك	سداسى البروم	لا ينوب في الاثير البارد يذوب في البنزين Benzine الساخن	١٧٠ - ١٨٠°م
كليبا نودونيك Clupano donic (22:5 & 22:6)	عديد البروم	لا ينوب	يحترق عند درجة حرارة أعلي من ١٨٠°م ينصهر عند درجة حرارة أعلي من ٢٠٠° مع التحليل Decomposition

ب - اختبار لتكوين متشابهات الاحماض Alkali isomerization

يسخن الزيت مع ١,٣ مول بوتاسا كاوية في إثيلين جليكول علي درجة ١٨٠° م لمدة ٤٥ دقيقة ويقدر الامتصاص عند طول موجة ٣١٥ مستخدما بلانك - يكون الامتصاص أعلي من واحد في حالة زيوت الاسماك - ويجب قبل تفسير النتائج معرفة هل حدث أكسدة للزيت أو أضيف اليه ماء أو وجود زيت سمك متبلمر .

أ - اختبار بسون Besson لزيت Kapok :

يستخدم هذا الاختبار للعينات التي أجري عليها عملية تكرير بالقلوي ثم رشحت خلال تراب التبييض Diatomaceous earth في بعض الاحيان يعطي زيت بذرة القطن لون أحمر غامق مع إختيار بسون وعلي ذلك من الضروري يجب الاحتياط عند تفسير النتائج خاصة إذا وجدت كميه قليله من زيت Kapok وتعطي عادة الزيوت النباتية وزيت بذرة القطن لون أصفر غامق تحت نفس الظروف التاليه :

- يوضع ٥ - ١٠ سم٣ من الزيت أو الدهن المنصهر في انبوبة إختبار ويضاف كميه من الكلوروفورم أكبر قليلا من حجم العينه .

- يرج العينه حتي الذوبان ويضاف كمية من نترات الفضه (٢٪ نترات فضه في كحول مطلق) تساوي كمية العينه .

- يرج المخلوط لمدة ٣٠ ثانيه وتترك لمدة نصف ساعة .

- إذا وجد زيت Kapok تظهر عكارة بنية - سوداء وفي حالة وجود كميات قليله جدا من زيت Kapok يلاحظ لون أحمر - بني .

أ - الكشف عن وجود ثلاثي إستيارين في دهن الخنزير :

يستخدم رقم بومر Boemer في الكشف عن وجود دهن البقر والدهون الاخري المحتوية علي ثلاثي إستيارين في دهن الخنزير - وتعتمد هذه الطريقة علي الاختلاف في درجة الانصهار للجلسريدات ودرجة الانصهار للاحماض الدهنية المقابلة لها . ويلاحظ أن هذا الاختلاف يكون كبيرا بين دهن الخنزير ودهن البقر ولا تستخدم هذه الطريقة في حالة دهن الخنزير المهدرج . ويستخدم رقم بومر (عند تقديره بعناية) في الكشف عن وجود ١٠٪ دهن بقر في دهن الخنزير ويمكن أيضا أن يصل مستوي الكشف إلي ٥٪ .

الطريقة :

- ينقل ٢٠ جم من العينه المرشحة إلي مخبار وتضاف كمية من الأسيتون سبق تبريده الي ٣٠°م ± ٢°م بحيث يصل الحجم إلي ١٠٠ سم٣ .
- يرج جيدا حتي ذوبان العينه وتترك لمدة ١٨ ساعة علي درجة ٣٠°م ± ٢°م في حالة ما إذا كانت كمية البلورات الناتجة من ٢٠ جم غير كافية فانه يجب زيادة كمية عينه الدهن مع مراعاة أن تزداد نسبة الاسيتون زيادة طردية .
- تجري عملية طرد مركزي لمدة ٥ دقائق ويهمل السائل الرائق أو يسحب الجزء الرائق من المخبار .
- تضاف ٢٠ سم٣ من أسيتون (٣٠ ± ٢°م) للبلورات - يرج - طرد مركزي أو يسحب الجزء الرائق .
- تكرر هذه العملية مرة أخري باضافة ٢٠ سم٣ أسيتون مع الرج ثم الترشيح علي ورقة ترشيح وتنقل كاملا البللورات إلي ورقة الترشيح وتغسل ٥ مرات بكميات قليلة من الاسيتون .
- يجري سحب الاسيتون من البلورات باستعمال مضخة تفريغ - ثم تنقل البلورات إلي زجاجة ساعه ويكسر أي تجمعات Lumps وتترك لتجف وتقدر درجة الانصهار لها .
- تؤخذ كمية من البلورات وتجري لها عملية تصبن باضافة ١٠٠ سم٣ من بوتاسا كاويه (٠.٥ ع) ويوضع فوق دورق التصبن قمع صغير لمنع التبخر أثناء التسخين وتجري عملية التصبن للدهن بالتسخين لمدة ١ ساعة .
- يضاف ١٠٠ سم٣ ماء مقطر الي محلول الصابون ويبخر علي حمام مائى يغلي للتخلص من الكحول بقدر الامكان .
- ينقل المحلول المائى إلي قمع فصل وتضاف كمية أخري من الماء المقطر حتي يصبح الحجم الكلي ٢٥٠ سم٣ وتعادل القلوية بواسطة حامض هيدروكلوريك (٥٠٪) وتضاف كمية بسيطة زائدة منه .
- تستخلص الاحماض الدهنية بواسطة ٧٥ سم٣ إثير مع الرج - تهمل الطبقه المائية وتغسل طبقة الزيت بالماء المقطر علي الاقل ٣ مرات حتي يكون ناتج الغسيل متعادل بالنسبه لبرتقال الميثايل .

تسحب طبقة الاثير - ترشيح - يبخر الاثير علي حمام مائى يغلي - تجفف الاحماض الدهنيه علي درجة ١٠٠°م لعدة دقائق .

تقدر درجة الانصهار للجلسريدات باستعمال ثلاث أنابيب قياسية لتقدير درجة الانصهار ويسمح للبلورات بان تدخل الي الطرف المغلق من الانبوبة بواسطة سلك رفيع . وأيضا يجهز ثلاث أنابيب قياسية لتقدير درجة الانصهار للاحماض الدهنية - ويسمح للانابيب المحتوية علي الاحماض الدهنية بأن تترك لمدة نصف ساعة في حمام مائى مثلج أو تترك في الثلاجة علي ٤° - صفر م لمدة ١٢ ساعة ثم تقدر درجة الانصهار للبلورات والاحماض الدهنية في نفس الوقت ثم يحسب رقم بومرمن المعادلة .

رقم بومر = أ + ٢ (أ - ب) .

حيث أن أ ، ب تمثل درجات الانصهار للجلسريدات والاحماض الدهنية علي التوالي ويعتبر أن دهن الخنزير مخلوط أو مغشوش اذا كان رقم بومر اقل من ٧٣ .

ثالثا : تركيب الاحماض الدهنية والمواد غير المتصبنة .

يبين الجدول (٨) النسب المئوية للأحماض الدهنية في بعض الزيوت والدهون الشائعة :

الزيت	لوريك	ميرستيك	بالميتيك	إستياريك	أرشيديك	أوليك	لينوليك	لينولينيك
الكتان	-	-	-	٩	-	٢٣	٢٠	٤٨
القرطم	-	-	٥	١	١	٢٠	٧٠	-
فول الصويا	-	-	٩	٢	١	٣٢	٥٣	٣
عباد الشمس	-	-	٥	٢	١	٣٥	٥٧	-
الذرة	-	-	٦	٢	١	٣٧	٥٤	-
السمسم	-	-	٨	٣	١	٤٧	٤١	-
القطن	-	١	٢١	٢	١	٢٥	٥٠	-
الشلجم	-	-	١	١	-	٢٢	٢٢	٣
فول سوداني	-	-	٨	٤	٣	٥٥	٢٥	-
زيتون	-	١	٩	١	١	٨٠	٨	-
النخيل	-	٢	٤٢	٤	-	٤٢	١٠	-
دهن لبن البقر	٣	١٠	٣١	١٠	-	٢٧	١	-
دهن لبن الماعز	٦	١٢	٢٨	٦	-	٢١	٤	-

والجدير بالذكر أن زيت بذرة القطن – زيت الفول السودانى – زيت الذرة – زيت السمسم – زيت عباد الشمس – زيت الزيتون – زيت النخيل تحتوى على أحماض أوليك ولينوليك بدرجة عالية – وأن زيت الكتان – زيت البيرللا – زيت فول الصويا – زيت بذرة القنب – تحتوى على حامض اللينولينيك بدرجة عالية – وأن زيت الشلجم – زيت الخردل – زيت رافيسون تحتوى على حامض إيروسيك بتركيز عالى .

ويستغل تركيب الاحماض الدهنية لليبيدات فى معرفة العائلة النباتية وكذلك الاصناف التى تتبع عائلة واحدة التى تم إستخلاص الليبيدات منها فمثلا إستخدم تركيب الاحماض الدهنية لليبيدات المستخلصة من بعض حبوب اللقاح فى معرفة العائلات النباتية التى جمعت منها فمثلا: حبوب اللقاح من البرسيم المصرى (العائلة البقولية) – الفول (العائلة البقولية) – الخردل Mustard (العائلة الصليبية) – عباد الشمس (العائلة المركبة) – الكتان (العائلة الكتانية) – الموالح (العائلة Rutaceae) تم استخلاص الليبيدات منها وفصلت الاحماض الدهنية وتم التعرف عليها وصفيا وكميا بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى .

والجدول (٩) يبين تركيب الاحماض الدهنية لحبوب اللقاح التى تتبع عائلات نباتية مختلفه

النسبه المئوية للاحماض الدهنيه فى بعض حبوب اللقاح

الحماض الدهنى	البرسيم	الفول	الخردل	عباد الشمس	الكتان	الموالح
كابريك	–	–	٠.٨٤	٠.١٣	–	–
لوريك	–	٠.٢	٠.٢٣	٠.٠٩	٠.٠٦	٠.٤٣
ميرستيك	٢١.٢٢	١٢.٢٤	٢١.٣٤	٤٧.٦٢	١٠.٩٧	١٤.١٧
ميرستواوليك	–	٢.٤٩	٤.٧٤	–	١.١٢	–
بالميتيك	١٨.٣٩	٢٣.٥٠	١٥.٩١	١٠.٢٧	٢١.٥٨	١٧.٢٨
بالميتواوليك	٥.٢٦	٤.٧٩	٦.١٢	٢٠.٢٧	٢.٥٥	٤.٧٥
إستياريك	٣.٠٧	٤.٦٧	٩.٢٢	٥.٠٢	٢.٣٠	٤.٠٥
أوليك	١٠.٢٢	١٤.٢٩	٣.٩٠	٧.٥٨	١٤.٢١	١٨.٤٣
لينوليك	٩.٦٤	١٢.٩٩	٦.٥٤	٥.٣٨	٣.٤٤	٢٧.١٨
لينولينيك	٣٢.٣١	٤٢.٨٢	٢٩.٤٥	٣.٦٣	٤٢.٩٠	١١.٢٥
أر اشيديك	–	–	١.٧٢	–	٠.٨٨	٢.٢٧

كما استخدم الجزء الغير متصبن من الليبيدات المستخلصه من جبوب اللقاح السابق الذكر لمعرفة المصدر النباتى التى جمعت منه ويظهر ذلك من الجدول (١٠) :

النسبة المئوية لمكونات المواد الغير متصبنه فى ليبيدات بعض حبوب اللقاح

المكون	البرسيم	الفول	الخردل	عباد الشمس	الكتان	الموالح
أولا : الهيدروكربونات						
٢٠	–	–	–	١٠,٠٩	–	–
٢١	٩,٥٩	٩,٠٢	–	١٤,٧٢	٦,٤١	–
٢٢	٢,٢٤	١,٤٦	٢,٠٦	٣,٠٢	١,٤٦	٣,٢٢
٢٢	٤,١٦	١١,٩٨	٤,٣٨	٨,٨٠	٩,٠١	٨,٩٦
٢٣	٠,٤٤	٠,٩٥	–	٠,١٤	١,١٨	٠,٩٩
٢٤	٢,٠٨	–	١,٣٠	٠,٦٥	–	٠,٣٠
٢٥	٣,٢٦	٧,٩٣	٩,٥٤	٦,٦٣	٩,٩٩	١٣,٨٧
٢٦	٠,٢٥	–	–	–	–	–
٢٦	٦,٠٧	٢٦,٧٦	٢,٨٨	١٢,٣٦	١٨,٥٥	٢١,٣٩
٢٦	١,٠٥	–	١,٥٤	٠,١٦	٠,٠٩	١,٠٧
٢٨	٢,١٦	٢,٦٠	٢,٩٩	٤,١٦	٥,٠٦	٦,١٠
٢٩	٠,٨٤	–	٠,٣٤	–	–	٠,٤٦
إسكوالين	١,٣٤	٦,٣٠	١,٠٦	٦,٣٧	٦,٦١	٥,٨٥
٣٠	٠,٤٩	٠,١٢	٦,٦٣	٠,٥٣	٠,٢٨	٣,٢٨
٣١	٢,٥٢	٤,٤٥	١,٠٥	٥,١٠	٣,٥٦	٣,٢٥
٣١	٠,١٠	٠,٠٨	–	٠,٥٥	٠,٦٤	٠,٢٣
٣١	١,٤٤	١,٢	١,٥٠	٠,٧٨	١,٧٧	١,٥٥
٣٢						
ثانيا :الاستيرولات						
كولستيرول	–	٢٩	١,٠٨	٠,٧٤	٠,٤٤	٠,٣٨
ستيجماستيرول	–	١,٢٩	–	١,٦٣	٢,٩٣	٢,٧٦
بيتا سيتوستيرول	٢,٢٤	٧,٣٦	١٢,٠٤	١١,٢٩	٥,٦٧	٦,٨٦

Farag et al (1980 b)

وقد تستخدم التركيزات الكلية للهيدروكربونات والتركيزات الكلية للاستيرولات وهى مكونات المواد غير المتصبنه ونسبهم الى بعض فى تمييز المصدر النباتى لحبوب اللقاح كما فى الجدول التالى

النسبة المئوية والنسب ما بين الهيدروكربونات

والاستيرولات الكلية لحبوب اللقاح جدول (١١)

المصدر النباتي	الهيدروكربونات الكلية (أ)	الاستيرولات الكلية (ب)	أ : ب
البرسيم	٤٠.٥٦	٥٩.٤٤	١:٠.٦٨
الفول	٨١.٧٥	١٨.٢٥	١:٤.٤٨
الخردل	٣٧.٦١	٦٢.٣٩	١:٠.٦٠
عباش الشمس	٧٨.٤٦	٢١.٥٤	١:٣.٦٤
الكتان	٧٢.٢٧	٢٧.٧٣	١:٢.٦١
الموالح	٧٤.٩٨	٢٥.٠٢	١:٢.٩٩

واستخدام تركيب الاحماض الدهنيه والمواد غير المتصبنه أيضا فى التعرف على الفطريات التى تتبع جنس واحد وأجناس مختلفة كما فى الجداول التالية :

جدول (١٢)

الحماض الدهنى	A.flavus	A.mellus	A.nidulans	A.niger	P.oxalicum	F.moniliforme
كابريك	–	٠.٢٦	٠.٢	–	٠.٤	١
١١ : صفر	–	–	–	–	–	٢.٩
ميرستيك	،٥٠	–	٠.١٥	٠.٦٠	٠.٤	١.٩
بنتاديكانويك	٠.٠٥	–	٠.١٢	٠.٣٠	٠.٢	١.٤
بنتاديسينويك	–	–	٠.٧٠	–	٠.٨	–
بالميتيك	١٥.٨٠	١٣.٩٠	١٩.٨٠	٢٠.٥٠	٣٦.٥	٠.٩
بالميتواوليك	٢.٠٠	٣.٨٠	٣.٣٠	٣.٤٠	٤.٢	٨.٢
مارجاريك	٠.٤٠	–	٠.٢٠	٠.٥٠	٠.٢	–
إستياريك	١٧.٦٠	٤.٨٠	١١.٧٠	١٥.١٠	١٤.٤	٥.٢
أوليك	٢٥.١٠	٢٣.٩٠	٣٩.٤٠	٣٤.٥٠	٣٣.٧	٣٠.٨
لينوليك	١٥.٦٢	١٩.٩١	١٢.٦٠	١٨.٤٠	٥.٦	٣٥.١
أراشيديك	٢٢.٩٣	٣٠.٨٠	٩.٤٠	٦.٧٠	٣.٦	١٣.٦
بهنك	–	٢.٦٤	٢.٤٣	–	–	–

Farag et al (1981 a)

النسبة المئوية لمكونات المواد غير المتصبنة

فى ليبيدات بعض الفطريات

جدول(١٣)

الحماض الدهنى	A.flavus	A.mellus	A.nidulans	A.niger	P.oxalicum	F.moniliforme
الهيدروكربونات						
٢١	-	-	-	-ر٦	-	-
٢٢	-	٣٣.٢٩	٣٠.٣٠	٢٠.٣٠	-	٤٠.٠
٢٣	٨.٧٩	-	-	-	-	٠.٨
٢٤	١١.٦٢	٢.٧١	٢.٢٧	-	-	٠.٨
٢٥	-	-	-	١.٦٨	-	-
٢٨	٢٧.٦٣	٢٧.٤١	٢٢.٧٣	-	٦٤.٢٢	٥.٦٠
٢٩	٤.٧١	١.٠٢	١.٥٢	-	-	٠.٥٣
٣٠	-	١.٣٦	١.٥٢	٠.٥١	-	-
٣١	٢.٥١	-	-	-	٥.٥٥	-
٣٢	٣.٩٢	٤.٤١	٢.٥٣	١.٢٥	٧.٣٩	-
٣٣	١.٨٨	-	-	-	٣.٧٠	-
الاستيرولات						
كولستيرول	٦.٤٤	١٦.٢٠	٤.٥٥	-	٣.٧٠	٢٨.٣٣
كامبستيرول	٤.٤٠	٨.١٤	٢٩.٥٣	٢٨.٢٦	٢.٧٧	-
إستجماستيرول	١.٨٨	٦.١٠	-	-	٠.٥٥	٣.٢٠
بيتا سيتوستيرول	٢١.٩٨	٣.٣٦	٥.٠٥	٣٤.٨١	٨.٣٢	٣.٧٢
٪للهيدروكربونات	٦١.٠٦	٧٤.٤٧	٦٠.٠٧	٣٠.١٤	٨٠.٩٧	٤٨.٢٦
كامبستيرول/ ستيجماستيرول	٥:١	٠.٤:١	٠.١٧:١	١.٢٣:١	١:٣	-

Farag et al (1981 b)

وفيما يلى الطرق التى تستخدم للتعرف على نوعية الاحماض الدهنية والمواد غير المتصبنة.

١ - التعرف على نوعية الاحماض الدهنيه

يعتبر تقدير الاحماض الدهنية جزء أساسى فى تحليل الجلسريدات ويعتبر CLC هو الوسيله المفضله لتحليل الاحماض الدهنية وأنه يلزم لتحليل الاحماض الدهنية تحويلها الى صورة إستر الميثايل .

طريقة تحضير إستر الميثايل للاحماض الدهنية :

توجد عدة طرق لتحويل الجلسريدات الثلاثة الى إستر الميثايل للاحماض الدهنية منها التحليل الميثانولى Methanolysis فى وجود حامض هيدروكلوريك ، حامض كبريتيك ، بوتاسا كاوية . ميثوكسيد صوديوم أو ثالث فلوريد البورون كعامل مساعد وفيما يلى أحد ابسط الطرق التى تعتمد على استخدام الميثانول فى وجود بوتاسا كاوية للعالم Brockerhoff .

- يذاب ١ - ٤٠ مجم جلسريد ثلاثى فى ٥ر سم^{3} إثير ويضاف ١ سم^{3} بوتاسا كاوية (٥ . ٠ ع) مذابة فى كحول ميثايل .
- ترج محتويات المخلوط وتترك لمدة ١٠ دقائق على درجة حرارة الغرفة ويضاف ١ سم^{3} من ١ ع حامض هيدروكلوريك .
- تستخلص إسترات الميثايل للاحماض الدهنية بواسطة ٣ × ١ سم^{3} إثير البترول - وتجمع المستخلصات فى أنبوبة ويبخر المذيب بواسطة النتروجين - ثم تذاب إسترات الميثايل بواسطة ثانى كبريتيد الكربون للتحليل بواسطة GLC .

وتظهر مشكلة بنوع خاص للاحماض الدهنية التى تحتوى على ١٠ ذرات كربون أو أقل حيث أن إستر الميثايل لها متطايرة وتذوب بقله فى الماء وهذا يؤدى الى حدوث فقد أثناء عملية الاستخلاص وتبخير المذيب وتوجد طريقتين للتغلب على مشكلة الاحماض الدهنية قصيرة السلسلة وهما :-

١ - تحلل الاحماض الدهنية بواسطة GLC على صورة إسترات لكحولات طويلة السلسلة مثل كحول البيوتايل .

٢ - لا يجرى عملية تبخير للمذيب أثناء تحضير إستر الميثايل وتحقن كمية كبيرة من المستخلص الكلى أو مخلوط التفاعل فى جهاز GLC .

ظروف الفصل للاحماض الدهنية بجهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى GLC (Farag et al 1986)

لفصل إسترات الميثايل للاحماض الدهنية يستخدم عمود أبعاده (١.٥ متر × ٤مم) معبأ بمادة دياتوميت Diatomite C قطر حبيباتها (120 - 100) ومغطاه بمادة عديد الاثيلين جليكول أديبات (١٠ ٪) Poly ethylene glycol adipate (PEGA) ويستخدم للفصل نظام حرارى حيث يسخن العمود من درجة حرارة إبتدائية ٧٠ ْم إلى درجة حرارة عظمى ١٩٠ ْم وترتفع درجة الحرارة بمعدل ٨ ْم / دقيقة ثم يستمر الفصل على درجة الحرارة النهائية ١٩٠ ْم لمدة ١٥ دقيقة باستخدام النيتروجين كغاز حامل بمعدل سريان ٣٠ مل / دقيقة والجهاز مزود بكاشف من نوع (Flame ionization detector (FID .

٢ - المواد غير المتصبنة

Unsaponifiable matter

تعرف محتويات الزيوت والدهون من المواد غير المتصبنه بانها المركبات التى تنوب فى مذيبات الدهون ولكن لا تتصبن بواسطة القلوى ولا تتطاير بالتسخين على ٨٠ ْم . وتتكون هذه المواد أساسا من كحولات اليفاتيه عاليه فى عدد ذرات الكربون - الاستيرولات - الصبغات - الهيدروكروبونات ... الخ .

توجد طريقتين لإستخلاص المواد غير المتصبنة تبعا لنوع المذيب وهما الإستخلاص بواسطة إثير البترول والاثير . وكلا الطريقتين تعطيان كميات من المواد غير المتصبنه تقريبا متساوية فى حالة الدهون العادية التى تحتوى على كميات عادية ولكن تعتبر طريقة الاستخلاص بواسطة إثير البترول غير مرضية لاستخلاص المواد غير المتصبنه للدهون التى تحتوى على كميات عالية من المواد غير المتصبنه مثل زيوت الكائنات البحرية أو أى أنواع أخرى من الدهون التى تحتوى على كميات أكثر من العادية وفى هذه الحالة يفضل الاستخلاص بالاثير حتى يعطى كمية منها تقارب النتائج الصحيحة ، تحتوى أغلب الزيوت والدهون النقية على أقل من ٢٪ مواد غير متصبنه .

فى بعض الاحيان يضاف زيت معدنى كنوع من الغش وللكشف عن هذا الغش يجرى اختبار وصفى qualitative test كما يلى :

١ - يوضع فى أنبوبة إختبار ١٠ نقط زيت نباتى أو دهن مصهور ثم يضاف ٥ سم٣ من ٠.٥

مول بوتاسا كحولية ويسخن على حمام مائى يغلى ثم الرج من وقت لآخر لعدة دقائق للتأكد من تمام التفاعل .

٢ - يضاف الى محلول الصابون الساخن $\frac{1}{2}$ سم³ ماء فى كل مره حتى يصبح الحجم الكلى المضاف ١٠ سم³ ثم يرج المحلول ويلاحظ ماذا يحدث بعد كل اضافة ماء - اذا تكونت عكاره فهذا يدل على وجود زيوت معدنية .

أولا : طريقة الاستخلاص بواسطة اثير البترول Petroleum ether

١ - يوزن ٥ جم عينه متجانسه ويضاف اليها ٣٠ سم³ ٩٥٪ كحول و ٥ سم³ بوتاسا كاوية مائية ٥٠٪ (وزن / وزن).

٢ - يغلى بانتظام تحت مكثف عاكس لمدة ساعة حتى يحدث تصبن كامل للدهن .

٣ - ينقل محلول الصابون الى قمع فصل وللنقل كميا يغسل دورق التصبن بواسطة ٤٠ سم³ كحول ٩٥٪ ، ٤٠ سم³ ماء مقطر ساخن ثم بكمية قليلة من إثير البترول ثم يضاف الى قمع الفصل ٥٠ سم³ من إثير البترول .

٤ - يرج قمع الفصل جيدا لمدة دقيقه ويترك حتى تنفصل الطبقات - ثم تنقل طبقة الاثير البترول الى قمع فصل آخر وتستخلص الطبقة المائية على الاقل ٤ مرات بواسطة اثير البترول ويجمع مستخلص إثير البترولى الكلى ويغسل ٣ مرات كل مرة ٢٥ سم٣ بواسطة ١٠٪ كحول مع الرج الشديد وإهمال طبقة الكحول فى كل مرة .

٥ - ينقل المستخلص إثير البترول الى كأس معروف الوزن ويبخر للجفاف باستعمال حمام مائى ثم يوضع فى الفرن تحت تفريغ على درجة ٧٥°م حتى ثبات الوزن .

٦ - بعد الوزن يذاب الراسب فى ٥٠ سم٣ ٩٥٪ كحول يحتوى على دليل فينولفيثالين سبق معادلته إلى اللون الاحمر الفاتح ثم يعاير بواسطة ٠,٠٢ ع صودا كاوية حتى تصل الى نفس اللون .

وزن الاحماض الدهنية المستخلص (جم) = عدد ملليمترات ٠,٠٢ صودا كاويه ×٠,٠٠٥٦

النسبة المئوية للمادة غير المتصبنه = $\frac{\text{وزن المتبقى - وزن الاحماض الدهنية} \times ١٠٠}{\text{وزن العينه}}$

ثانيا : استخلاص المواد غير المتصبنه بواسطة الاثير Diethyl ether

١ - يوزن بالضبط ٢ - ٢,٥ جم عينه ويضاف اليها ٢٥ سم٣ كحول + ٠,٥ ٢١جم من محلول بوتاسا كاوية مركزة (٥٠٪ وزن / وزن) ثم يرج ثم يسخن فى حمام مائى تحت مكثف عاكس مع التحريك من وقت لآخر حركة مروحية لمدة نصف ساعة .

٢ - ينقل المحلول وهو ساخن الى قمع فصل ويغسل دورق التصبن بحوالى ٥٠ سم٣ ماء ثم ٥٠ سم٣ إثير وينقل إلى قمع الفصل .

٣ - يقفل قمع الفصل ويرج جيدا بشده مع الاحتراس من تولد ضغط داخل القمع وتترك الطبقات لكى تنفصل ثم تنقل الطبقة العلوية الى قمع فصل آخر يحتوى على ٢٠ سم٣ ماء وتكرر عملية الاستخلاص مرتين كل مرة ٥٠ سم٣ كحول - ثم يجمع المستخلص الاثيرى .

٤ - ترج محتويات قمع الفصل ثم يترك لتنفصل الطبقات وبعد الاتزان تهمل طبقة الماء ثم تجرى عملية غسيل لطبقة الاثير مرتين بواسطة الماء كل مرة بـ ٢٠ سم٣ ماء وتهمل فى كل مرة طبقة الماء ثم تغسل طبقة الاثير ٣ مرات كل مرة بواسطة ٢٠ سم٣ بوتاسا مائية ٠,٥ ع ويغسل بالماء ٢٠ سم٣ بعد كل مرة غسيل بالقلوى . قد يتكون مستحلب فى هذه الحالة وبالتالى يجب ترك قمع الفصل جانبا حتى يحدث فصل للطبقات - بعد الغسيل فى المرة الثالثة بالقلوى تغسل طبقة الاثير بالماء عدة مرات حتى تصبح متعادلة بالنسبة لدليل الفينولفيثالين .

٥ - ينقل المستخلص الاثيرى الى دورق سبق وزنه يبخر الاثير وعند تمام تبخر الاثير يضاف ٢ أو ٣ سم٣ أسيتون ويبخر للجفاف فى وجود تيار من الهواء . ثم تكمل عملية التجفيف فى فرن تفريغ على درجة ٧٥ - ٨٠°م حتى الوزن الثابت .

٦ - بعد الوزن يذاب المتبقى فى الدورق بـ ٢ سم٣ إثير ثم يضاف ١٠ سم٣ كحول متعادل الى اللون القرمزى الفاتح باستعمال دليل الفينولفيتالين ثم تعاير محتويات الدورق بواسطة ٠,٠٢ ع بوتاسا كاوية حتى نصل الى نفس اللون القرمزى .

٧ - يحسب وزن المواد غير المتصبنه المضبوطة بعد طرح الاحماض الدهنية الحره على أساس ١ سم٣ من ٠,٠٢ ع صودا كاوية تكافىء ٠,٠٠٥٦ جم حامض أوليك - ومن المعادلة التالية يمكن حساب النسبة المئوية للمواد غير المتصبنه .

المواد غير المتصبنة =

وزن المواد غير المتصبنه – وزن الاحماض الدهنية – وزن البلانك × ١٠٠
____
وزن العينة .

ظروف الفصل بواسطة التحليل الكروماتوجرافى الغازى GLC (Farag et al 1986)

تفصل المواد الغير متصبنه باستخدام عمود أبعاده (١.٤ متر × ٤مم) معبأ بمادة Diatomite-C قطر حبيباتها (100 - 120 mesh) ومغطاه بمادة سيليكون من نوع OV - 17 بتركيز ١ ٪ ويستخدم للفصل نظام حرارى حيث يسخن العمود من ٧٠ مْ (حرارة إبتدائيه) الى ٢٧٠ مْ (حرارة عظمى) بمعدل ١٠ ْ م / دقيقة . ثم يستمر التسخين على درجة الحرارة العظمى Isothermally لمدة ١٥ دقيقة – وبمعدل سريان للنيتروجين كغاز حامل مقدار ٣٠ مل / دقيقة .

الفصل الثالث

التزنخ Rancidity

يحدث لليبيدات تغيرات أثناء التخزين ونتيجة لذلك ينتج طعم ورائحة غير مقبولة وهذا ما يعبر عنه بالتزنخ – ويحدث التزنخ بتأثير الهواء (تزنخ أكسيدى oxidative) أو بواسطة الكائنات الدقيقة (تزنخ تحللى Hydrolytic) ويسرع التزنخ الاكسيدى بالتعرض للحرارة والضوء والرطوبة فى وجود آثار من عناصر معينه (نحاس – حديد – نيكل) – ومن المعروف أن الليبيدات تمتص الاكسوجين ويتكون مركبات تظهر خصائص البيروكسيدات وبصفه عامه الماده التى تحتوى عل نسبة عالية من عدم التشبع (رقم يودى مرتفع) تكون سهلة التعرض للتزنخ الاكسيدى وعندما يصل تركيز الهيدروبيروكسيدات إلى حد معين تحدث تغيرات كيماوية معقده وتتكون مركبات متطايرة وهى المسئولة عن إعطاء الرائحة والطعم المتزنخ ويحدث لاغلب الزيوت والدهون زيادة فى الحوضة الحرة Free acidity أثناء التخزين ولكن فى حالة الزيوت المكرره Refined فان مستوى الحموضه الحرة يكون منخفضا بدرجة لا تسمح بظهور التزنخ.

وتجرى إختبارات التزنخ على الزيت أو الدهن المؤكسد كما أنه يمكن تحضير مركبات عاليه فى محتواها من نواتج الاكسده حيث تؤخذ وزنه من إسترات حامض اللينوليك واللينولينيك (١٠٠ مجم من كل حامض نقاوته ٩٨٪) ويجرى لها أكسدة ذاتيه بتعريضها الى أشعة فوق البنفسجية عند درجة حرارة الغرفة – كما تحضر هيدروبيروكسيدات حامض اللينوليك بأكسدة حامض اللينوليك بواسطة إنزيم الليبوأكس جينيز Lipoxygenase – فى الحالة الاولى تكون قيمة البيروكسيد منخفضة على العكس من الطريقة الثانية فتكون مرتفعه – تذاب الاحماض الدهنية المؤكسدة فى خليط مكون هكسان حلقى والاثير (٩: ١ حجم / حجم) .

يدل لفظ الثبات للزيوت والدهون الطبيعية ومنتجاتها على مقاومتها Resistance للاكسدة وبصفه خاصه الاكسده بواسطة أكسوجين الهواء الجوى – ويقدر ثبات الليبيد عاده إما بتقدير معدل تكوين نواتج الاكسده تحت ظروف تساعد على سرعة تكوينها Accelerated conditions (طريقة الاكسجين النشط) أو بتقدير معدل إمتصاص الاكسوجين عند درجات حرارة عالية .

ويجب أن يكون واضحا عند استعمال اختبارات ثبات الدهن التفرقة بين الطرق التى تقدر طول فترة الحفظ وبين التى تستخدم كمقياس Index لمعرفة حالة أكسدة العينه عند وقت الإختبار ومن الطرق التى تحت النوع الاول هى طريقة الاكسجين النشط Active oxygen (AOM) method والطرق المختلفة لتقدير الاكسجين الممتص - بينما تقدير رقم البيروكسيد - إختبار حامض الثيوباربيتيوريك واختبار كريس Kreis تعتبر من أفضل الطرق فى النوع الثانى .

الطرق المستخدمة لتقدير ثبات الزيوت والدهون

جدول(١٤)

الطريقة	نبذه عن طريقة العمل
١ - تقدير الاكسوجين الممتص Oxygen uptake	وفيها يتم إسراع الاكسدة بامرار تيار من الهواء فى العينة أو برفع درجة الحرارة أو كليهما معا وتؤخذ عينات من الزيت أو الدهن على فترات ويقدر لها الحموضة الحره أو رقم البيروكسيد وتوجد طرق أخرى لامتصاص الاكسوجين تعتمد على معرفة الزيادة فى وزن الزيت أو الدهن أو تقدير الانخفاض فى الضغط فى دورق مغلق بجهاز ڤاربورج Warburg .
٢ - اختبار Schaal أو اختبار الفرن	توضع العينة فى كأس ثم تسخن على درجة حرارة عالية (٦٣ - ٧٠ْم) وتظل على هذه الدرجة حتى تظهر رائحة التزنخ على أن يتم فحص العينة يوميا أو على فترات معينه .
٣ - إختبار حامض الثيو باربيتيوريك .	تعامل العينه بواسطة حامض الثيو باربيتيوريك ويدل كثافه اللون على مدى حالة الدهن أو الزيت المؤكسد.
٤ - إختبار كريس Kreis	تعامل العينه بواسطة جوهر كشاف فلوروجليسينول - وتدل الكثافه اللونيه على مدى حالة الدهن أو الزيت المؤكسد .
٥ - معامل الانكسار	حيث وجد أن رقم معامل الانكسار للزيوت المسخنة يرتفع مطابقا للزيادة فى رقم البيروكسيد .

تابع : الطرق المستخدمة لتقدير ثبات الزيوت والدهون

الطريقة	نبذه عن طريقة العمل
٦ - رقم البيروكسيد Peroxide value	يلاحظ أن رقم ٢٠ ملليمكافئات/ كيلو جرام دهن خنزير أو دهن بقر يدل على نهاية فترة الاعداد .
٧ - إختبار سويفت Swift stability test	يمرر تيار من الهواء فى عينه الدهن أو الزيت عند درجة ٩٨ْم ويقدر رقم البيروكسيد كل ساعة .
٨ - الامتصاص فى منطقة الاشعة الفوق بنفسجية U.V. absorption	يخفف ١/٢ سم٣ من محلول الحامض المؤكسد بواسطة ٣ سم٣ ميثانول وتسجل الامتصاصات عند الاطوال الموجية ٢٣٤ (للروابط الزوجية الثنائية المتبادلة) ٢٧٠ نانوميتر (للروابط الزوجية الثلاثية المتبادلة).
٩ - تفاعل ∝،∝ - Diphenyl - B-Picryl hydrazyl reaction	يضاف الى ٠.٦ سم٣ من العينه ٣ سم٣ من الجوهر الكشاف مخفف بـ٣ سم٣ من خليط المذيبات (هكسان حلقى + اثير) ويقدر الامتصاص عند طول موجه ٥١٧ نانوميتر مستخدما الجوهر الكشاف كبلانك .
١٠ - إختيار الحديد Fe - test	يجرى عمل مخلوط مكون من ٠.١ سم٣ عينه + ٤.٨٥ سم٣ من بنزين - ميثانول (٣:٧ حجم/ حجم) ٠.١ سم٣ ماء + ٣.٦ ميكرومول كبريتات حديدوز مذابه فى ٠.٠٢سم٣ حامض هيدروكلوريك (٣.٦٪) . يضاف ٠.٠٢ سم٣ محلول ثيوسيانات البوتاسيوم (٣٠٪) بعد نصف دقيقه من إضافة كبريتات الحديدوز ثم تقدر كثافة اللون المتكون .

تابع : الطرق المستخدمة لتقدير ثبات الزيوت والدهون

الطريقة	نبذه عن طريقة العمل
١١ - رقم الانيزيدين Anisidine Value	تمزج العينه (٢سم٣) مع ٤ سم٣ محلول ثلاثى كلوريد حامض الخليك (٠.١٪ مذابا فى الايثانول) و ٤ سم٣ من بارا أنيزيدين (٠.٢٥٪ مذابا فى الايثانول) - وبعد التسخين على درجة ٦٠ْم لمدة ساعة يقدر الامتصاص عند طول موجه ٤٠٠ نانوميتر ويستخدم الجواهر الكشافه كبلانك .
١٢ - اختبار الهبتانال Heptanal test	ترج العينه (٢سم٣) مع ١ سم٣ ثنائى نيتروفينايل هيدرازين (٠.٠٥٪ فى البنزين) و ١ سم٣ ميثانول و٠.٥ سم٣ حامض خليك (٦٠٪ فى البنزين) . تفصل الكميه الزائده من الجواهر الكشاف خلال متبادل كاتيونى ويسجل الامتصاص عند طول موجه ٣٦٦ نانوميتر باستخدام الجوهر الكشاف كبلانك .

وقبل ذكر الاختبارات التى تستخدم فى تقدير تزنخ الليبيدات فانه يلزم معرفة ميكانيكية الاكسدة الذاتيه بصورة مبسطة ومنها نستنتج طبيعة الاختبارات المختلفة المستخدمة فى تقدير تزنخ الليبيدات - وبصفه عامه يمكن تقسيم تفاعلات الاكسده الذاتيه الى قسمين :-

ا - التفاعل الأولى : Primary reaction

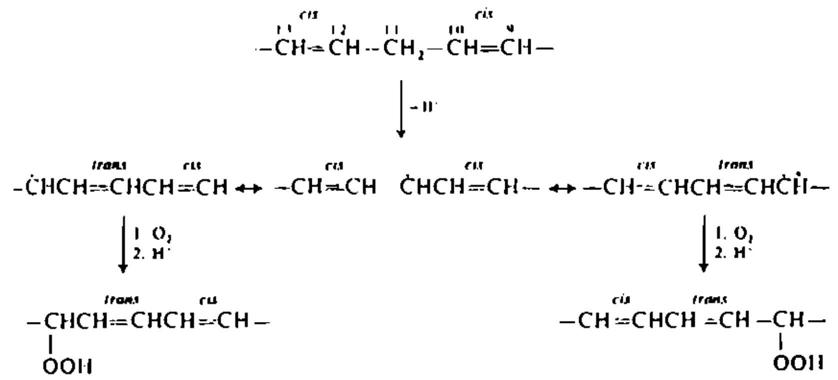
وفيه يتم تكوين هيدروبيروكسيدات الاحماض الدهنية الغير مشبعة وتتم هذه العمليه عن طريق ثلاث خطوات رئيسية وهى : -

أ - فقد ذرة إيدروجين من مجموعة ميثيلين نشطه وهى المجاورة للرابطه الزوجية لتكوين الكيل حر .

ب – حدوث عملية تردد أى تبادل أماكن الروابط الزوجية مع الالكترون للاكيل الحر وبذلك يتغير التركيب الفراغى للروابط الزوجية مع الالكترون للاكيل الحر وبذلك يتغير التركيب الفراغى للروابط غير المشبعه من الصورة المضاهية Cis إلى الصورة المخالفة Trans – كما أنه فى حالة وجود رابطتين زوجيتين أو اكثر فى جزىء الحامض الدهنى فان النظام غير المشبع الغير متبادل Non - conjugated system يتحول إلى النظام غير المشبع المتبادل Conjugated System .

جـ – تفاعل الالكيلات الحرة مع أكسوجين الهواء الجوى واكتساب ذرة إيدروجين من مجموعة ميثلين نشطه من جزىء حامض دهنى آخر لتكوين الهيدروبيروكسيدات .

والمثال التالى يبين ميكانيكية اكسدة ميثايل اللينوليات ذاتيا .



Autoxidation of methyl linoleate

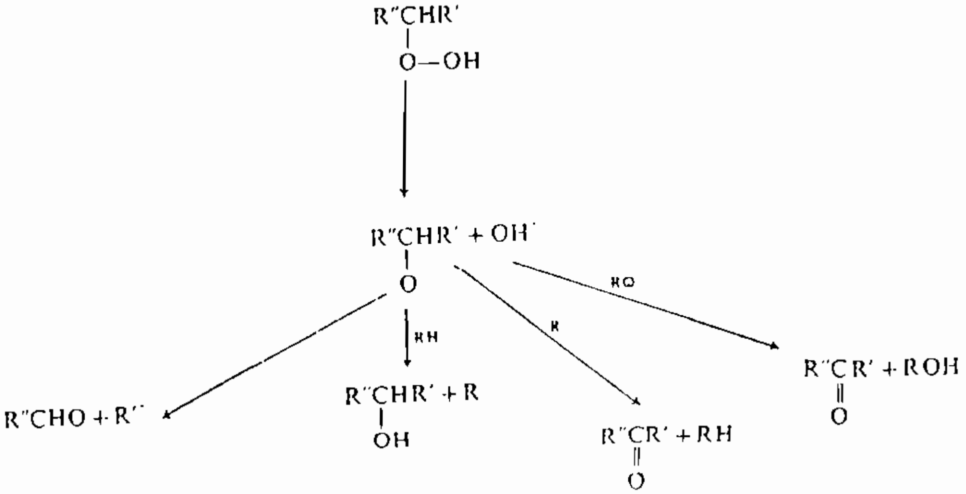
الاكسدة الذاتيه لميثايل اللينوليات

٢ - التفاعل الثانوى Secondary reaction

تعتبر هيدروبيروكسيدات الليبيدات مواد غير ثابته بدرجة كبيرة ولذلك تتعرض لعدة تفاعلات من أهمها ما يلى : –

أ – فقد أيون إيدروكسيل وتكوين الكوكسيدات حره .

ب – التفاعل مع الكيلات حره أو الكيل الكوكسي لتكوين كيتونات وكحولات عن طريق فقد أو إكتساب ذرة ايدروجين من ذرة الكربون المحملة بذرة اكسوجين على التوالى . كما يحدث انقسام على جانبى ذرة الكربون المرتبطة بذرة الاكسوجين وتكوين الدهيدات كما فى المثال العام التالى :

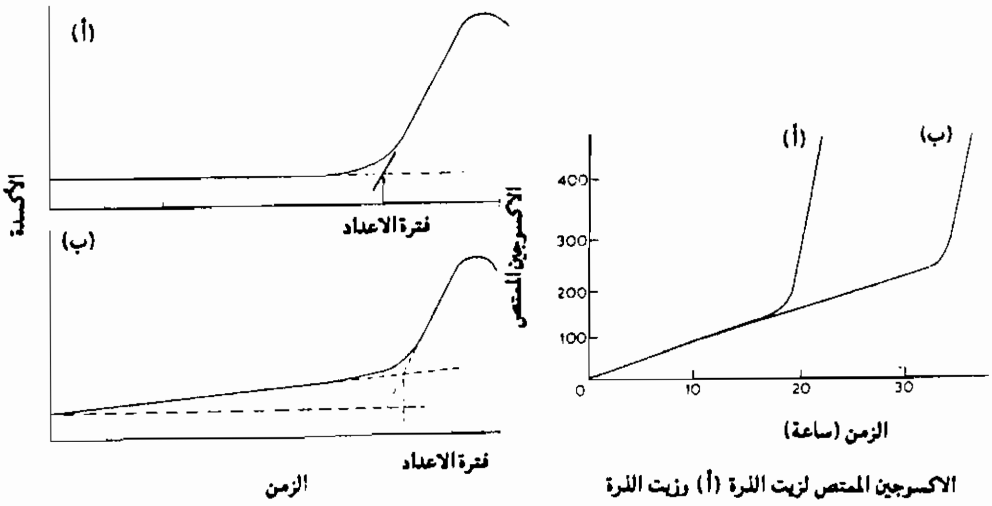


من ذلك يتضح أن تقدير تزنخ الليبيدات يعتمد على تقدير نواتج الاكسده الأولية والثانوية كما يلى :

اختبار سيلفستر : Sylvester test

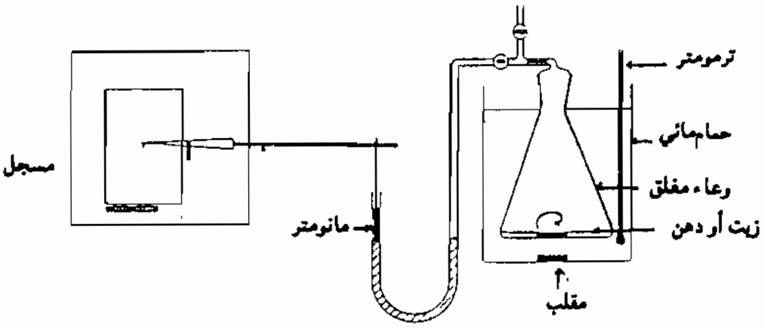
يعتمد هذا الاختبار على وضع عينه الدهن أو الزيت فى وعاء مغلق Closed vessel الذى يسخن على درجة ١٠٠°م بواسطة حمام مزود بثرموستات ويحرك Shaken باستمرار ويتفاعل اكسوجين الهواء الجوى فوق الزيت أو الدهن ببطء بواسطة الزيت أو الدهن حتى يصبح مؤكسدا وتسجل كمية الاكسوجين الممتص مع الوقت ، ومن المعروف أن الاكسدة تحدث فى بداية الامر ببطء نتيجة حماية الزيت بواسطة المواد المضاده للأكسدة الموجودة به وعندما تستنزف Exhaust المواد المضادة للاكسدة تزداد سرعة الاكسدة تدريجيا Progressively .

يبين منحنى إمتصاص الاكسوجين مع الوقت حدوث كسر واضح distinct break وعنده تتم نهاية فترة الاعداد Induction Period كما هو واضح فى الرسومات التالية :



الاكسوجين الممتص لزيت الذرة (أ) وزيت الذرة محتويات علي مادة مضادة للاكسدة (ب)

امثلة توضح منحنيات فترة الاعداد



جهاز لامتصاص الاكسوجين المستخدم بواسطة إختبار سيلفستر

طريقة ڤاربورج لتقدير الاكسوجين الممتص بواسطة الليبيدات

الإساس النظرى لجهاز ڤاربورج

يعتمد تقدير غاز الاكسوجين الممتص لنظام مغلق Closed system على أن تكون درجة الحرارة ثابتة ويقدر أى تغير فى حجم الغاز الممتص بواسطة التغير فى الضغط - وعموما يقدر حجم الاكسوجين الممتص عند ضغط معين وثابت وأن تكون درجة الحرارة ثابته خلال فترة التجربة - وبصفه عامة تعتمد طريقة ڤاربورج على قانونين :

١ - القانون العام للغازات

الضغط × الحجم = ثابت الغاز × درجة الحرارة المطلقة .

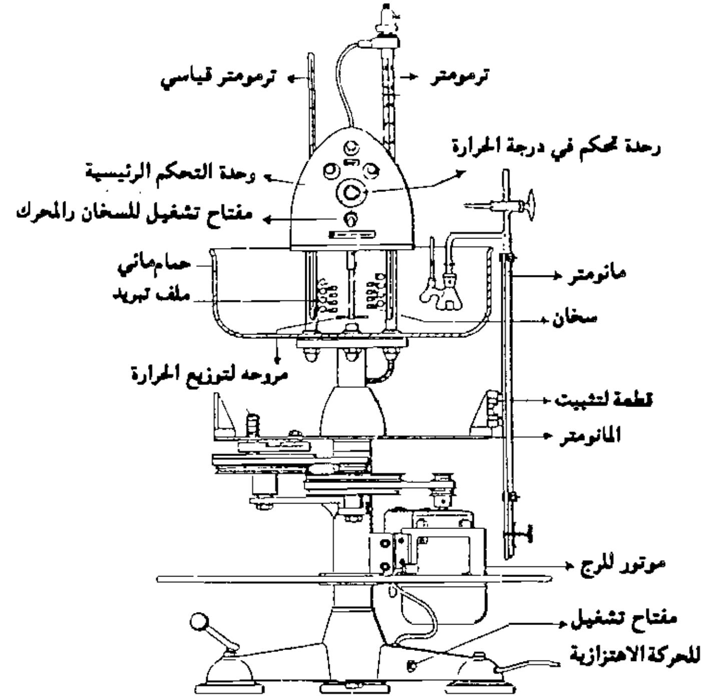
٢ - قانون هنرى : الذى ينص على أن ذوبان أى غاز فى سائل ما يتناسب طرديا مع الضغط الجزئى لهذا الغاز .

وعلى ذلك فإن الاساس النظرى لجهاز ڤاربورج يعتمد على قياس التغير فى الضغط الناتج من امتصاص حجم معين من الاكسوجين خلال التفاعل على أن يظل حجم النظام ثابتا وعند درجة حرارة ثابته ايضا .

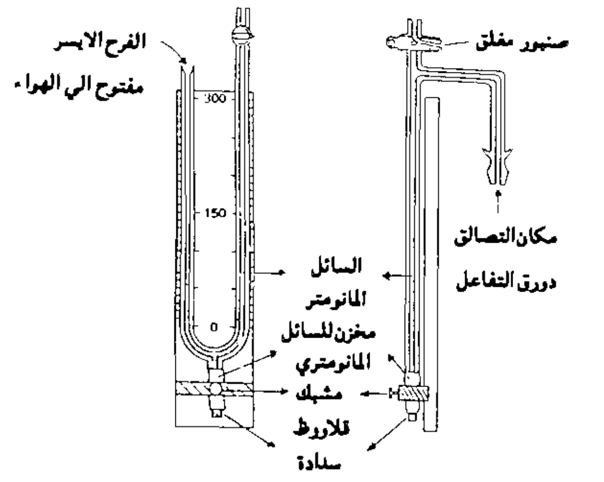
ولتحويل ملليمترات الضغط الى ميكرولتر غاز تضرب قيمة التغير فى الضغط فى عامل ثابت (K) كما هو مبين بطريقة الحساب .

جهاز ڤاربورج : Warburg apparatus

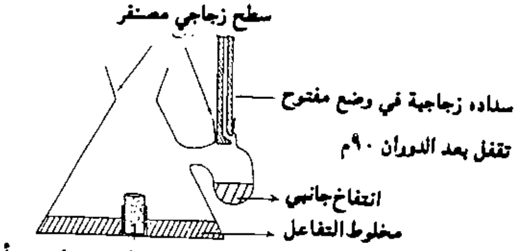
يستخدم جهاز ڤاربورج لقياس غاز الاكسوجين الممتص بواسطة الليبيدات وذلك بتقدير التغير فى الضغط لانبوبة شعرية لمانومتر فى نظام مغلق يظل على حجم ودرجة حرارة ثابتين - يتكون الجهاز من عدة وحدات (عادة ١٤ وحدة) كل وحدة يطلق عليها مانومتر Manometer والمانومتر عبارة عن أنبوبة شعرية على شكل حرف U ذات طول ٣٠ سم وقطر٢٥,١مم - يتصل الفرع الايمن Right Limb الذى يحمل من أعلى صنبور Tap بدورق التفاعل Reaction vessel بواسطة ذراع جانبى side arm ويكون الفرع اليسارى من المانومتر مفتوحا للهواء الجوى .



جهاز فاريورج



مانومتر جهاز فاربرج



وعاء مركزي يحتوي علي ١٠٪ بو أ يد
علي ورقة ترشيح لامتصاص ك أ ٢
وعاء التفاعل لجهاز فاربورج

يوضع المانومتر على لوح ومثبت على اللوح تدريج مقسم إلى سنتيمترات ومليمترات (غالبا ماتسجل القراءات بالميلليمترات) ويبدأ تدريج هذا المقياس فى معظم المانومترات من المنتصف أى يبدأ التدريج بحيث يكون فى منتصف المانومتر الصفر ويمتد ١٥٠ مم على جانبى الصفر ومن المعروف أن القراءات التى تحت الصفر تكون سالبه أى يحدث إمتصاص لغاز الاكسوجين بينما القراءات التى فوق الصفر تكون موجبه أى يخرج النظام فى الدورق غاز .

يوضع السائل المانومترى الذى يكون ملونا لتسهيل أخذ القراءه ومحتويا على منظف لتسهل حركته داخل المانومتر فى مستودع مطاط Rubber reservoir مثبت فى قاع المانومتر - ويمكن التحكم فى مستوى السائل فى المانومتر بواسطة مقبض قلاووظ مثبت فوق المستودع المطاطى الذى يجب أن يحتوى على كمية من السائل المانومترى تكفى لملأ الفرع الايمن باكمله . وعادة يكون دورق التفاعل ذو شكل مخروطى وسعته من ١٥ - ٢٠ سم٣ ومثبت به أنبوبة قصيرة مركزية Central well ويتصل بالدورق إنتفاخ صغير جانبى Side bulb ويلاحظ أن دورق التفاعل يثبت فى المانومتر بواسطة سوسته معدنية Steel spring .

ويمكن الحصول على درجة حرارة ثابتة خلال فترة التجربة بغمر دورق التفاعل فى حمام مائى مزود بثرموستات لضبط درجة الحرارة - وللتأكد من إتزان الغازات خلال التبادل الغازى يحرك المانومتر ذهابا وإيابا to and fro بواسطة جهاز تحريك حيث ترج الدوارق مع المانومترات أفقيا بسرعات تصل ما بين ١١٠ - ١١٥ هزة Oscillation فى الدقيقة بمسافة تصل من ٣ - ٤ سم .

ونظرا لان الفرع الايسر للمانومتر مفتوح للهواء الجوى فان ضغط النظام يتأثر بتغير الضغط الجوى وأيضا يتأثر بتغير درجة حرارة الحمام - وحيث أن كل هذه التغيرات تؤثر بدرجة واحده على كل المانومترات فانه يضاف مانومتر كبلانك لتقدير التغير فى الضغط الجوى أثناء التجربه ويسمى Thermo barometer ويجب أن يحتوى هذا المانومتر على حجم من السائل مثل الموجود فى دوراق التفاعل - وتسجل التغيرات فى الضغط بواسطة المانومتر (البلانك) ويطرح حسابيا من الارقام المسجلة من مانومترات التجارب .

طريقة العمل :

١ - توضع العينات فى دوارق ڤاربورج .

٢ - توصل الدوارق مع المانومترات المقابلة بعد تشحيمها للتأكد من عدم التنفيس وتثبيتها بالسوست المعدنيه ويجب أن تكون صنابر المانومترات مفتوحه .

٣ – توضع المانومترات فى الحمام المائى ذو درجة حرارة معينه مضبوطة بواسطة ثرموستات .

٤ – ترج المانومترات لمدة ٥ دقائق لكى يحدث اتزان .

٥ – فى حالة الرغبة فى إمتصاص أكبر حجم ممكن من الاكسوجين داخل جهاز فاربورج يخفض مستوى سائل المانومتر حتى بالقرب من نهاية المانومتر التى على شكل حرف U تقفل صنابر المانومترات – برفع السائل المانومترى حتى يصل إرتفاعه فى الفرع الأيمن (المتصل بالدورق) الى علامة الصفر – تؤخذ قراءة السائل المانومترى فى الفرع اليسارى .

٦ – للحصول على القراءات المتتالية بعد فترات زمنيه معينه يجرى :–

أ – يوقف رج المانومترات .

ب – يرفع السائل المانومترى بحيث يكون القراءة على الفرع الأيمن تساوى صفر .

جـ – تؤخذ القراءة من الفرع اليسارى .

طريق الحساب :

لمعرفة كمية الاكسوجين المتصه على أساس ملليمول يجرى الاتى : –

١ – تسجل قراءات المانومترات (وهى التى تحتوى على الزيت وأيضا البلانك) على فترات مختلفه بـ ميلليمتر (h) .

٢ – يحسب التغير فى القراءات مع الزمن أى تطرح قيمة القراءة عند بداية التجربة Δh لتعديل التغير فى الضغط الجوى .

٣ – يضرب التغير فى القراءة Δh فى ثابت المانومتر للحصول على الاكسوجين الممتص بالميكرولتر فى حجم أو وزنة العينة ثم تطرح قيمة Δh للبلانك من Δh للعينات للحصول على كمية الاكسوجين الممتصه المضبوطه μo_2/ Sample

٤ – تحسب كمية الاكسوجين الممتص بالميلليمول من معرفة أن الوزن الجزىء لاى غاز يشغل ٤ر٢٢ لتر تحت نفس الظروف كالاتى :

$$mM\ 0_2/L = \frac{\Delta h \times k}{22.4}$$

ولحساب ثابت المانومتر k تستعمل المعادله التالية :

$$k = \{ (Vg \times (273/T) + (Vf \times a) \} Po$$

حيث أن :

Vg = حجم الغاز الكلى فى المانومتر (الدورق + الانبوبة الشعرية حتى نقطة الصفر) .

T = درجة الحرارة المطلقة للحمام المائى = ٢٧٣ + t

إذا كانت t = ٣٠°م فأن :

T = ٢٧٣ + ٣٠ = ٣٠٣°

Vg = حجم السوائل أو العينات داخل المانومتر ٢ سم^{٣} = ٢٠٠٠ ميكرولتر .

a = معامل إتصاص الاكسوجين فى العينة أو المحلول

= ٠,٠٢٦ عند درجة ٣٠°م

Po = الضغط العادى بالميللترات (٧٦٠ مم زئبق) لسائل المانومتر وحيث أن كثافة السائل ١,٠٣٤ وأن كثافة= الزئبق ١٣,٦٠ حجم / سم٣ فان .

$$Po = \frac{١٣,٦٠ \times ٧٦٠}{١,٠٣٤} = ١٠٠٠٠$$

والمثال العددى يبين كيفية الحساب لكمية الاكسوجين الممتص

جدول(١٥)

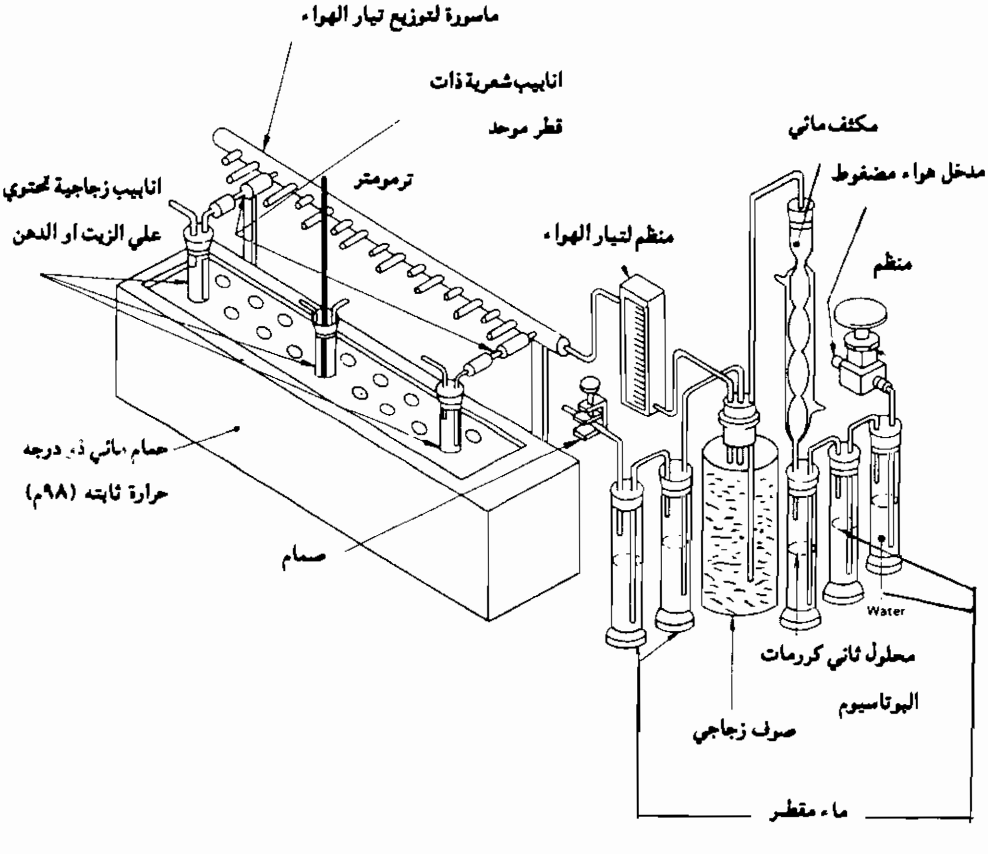
الزمن (دقيقة)	درجة الحرارة م°	مانومتر البلانك: القراءة	مانومتر البلانك: Δh	مانومتر التجربة: القراءة	مانومتر التجربة: Δh	Δh المضبوطة	μO_2 hxk
صفر	٣٧	١٥٠	صفر	٢٠٠	صفر	صفر	
٥	٣٧	١٤٨	٢ –	١٩٢	٨ –	٦ –	
١٠	٣٧	١٤٩	١ –	١٨٧	١٢ –	١٢ –	
١٥	٣٧,١	١٥٣	٣ +	١٨٥	١٦ –	١٩ –	
٢٠	٣٧,١	١٥٣	٣ +	١٧٩	٢١ –	٢٤ –	
٢٥	٣٧	١٥٠	صفر	١٦٩	٣١ –	٣١ –	

طريقة الاكسجين النشط

The active Oxygen method

اختبار سويفت : Swift test

إن الاساس الذي يبني عليه إختبار سويفت أو طريقة الاكسوجين النشط Active Oxygen Method (AOM) يختلف عن إختبار سيلفستر - حيث أنه في هذه الطريقة يمرر تيار من الهواء خلال زيت مسخن علي درجة حرارة ثابته وهي ٩٨ْم . وتؤخذ عينات من الزيت علي فترات زمنية مختلفة ويقدر فيها رقم البيروكسيد - ثم يرسم العلاقه ما بين رقم البيروكسيد والزمن ثم تحسب فترة الاعداد كما سبق ذكره في طريقة سيلفستر .



يستخدم جهاز سويفت Swift لتقدير الاكسجين النشط كا هو مبين بالرسم السابق ويتكون جهاز سويفت من الاجزاء التالية :

١ – حمام مائي أو سخان ذو درجة حرارة ثابته Constant temperature bath يعطي العينات جميعها درجة حرارة ٩٧.٨ْم أو ١١٠م ± ٢.٠ْم .

٢ – أنبوبة متفرعة لتوزيع الهواء Air distributing manifold وتصنع هذه الانبوبة من الحديد غير القابل للصدأ – النيكل – الومنيوم أو الزجاج .

٣ – أنابيب زجاجية شعرية Glass capillary tubes يجب أن تكون ذات سمك واحد وتعطي جميعها نفس معدل السريان (± ١٠٪) عند كل مدخل عندما يضبط مرور الهواء الكلي عند ٢.٣٣ سم^{3} لكل ثانية .

٤ – وسائل لتنقية الهواء Air purification

A : تمثل انبوبة مدخل الهواء من كباس هواء ومزوده بصمام تحكم لمرور الهواء .

B : عمود لغسل الهواء عبارة عن مخبار قطره ٥ سم وارتفاعه ٣٧.٥سم يحتوي علي ماء.

C : عمود لغسل الهواء عبارة عن مخبار قطره ٥ سم وإرتفاعه ٣٧.٥ سم يحتوي علي ٢٪ ثاني كرومات البوتاسيوم في ١٪ حامض كبريتيك ويملأ المخبار حتي إرتفاع ٢٥ سم ويغير المحلول بعد ٧٢ ساعه من العمل المستمر .

D : عمود لغسل الهواء عبارة عن مخبار قطره ٥ سم وارتفاعه ٣٧.٥ سم ويحتوي علي ماء ويمليء المخبار بالماء حتي إرتفاع ٢٥سم ويغير الماء في بداية ظهور لون أصفر .

E : مكثف لتبريد الهواء .

F : مصيده Trap عبارة عن زجاجة ذات فوهه واسعه تحتوي على صوف زجاجي .

G,H : أعمده لتنظيم الضغط عبارة عن مخابير قطرها ٥ سم وإرتفاعها ٣٧٫٥سم تحتوي علي ماء مقطر وتمليء بالماء حتي إرتفاع ٢٠ سم ويمكن أيضا تنظيم الضغط عن طريق منظم توزيع Regulating Valve .

أخذ العينه :

١ – في حالة الدهن المعبأ يجب أن تكون العبوة غير مفتوحة – وإذا وجدت الدهون في أوعيه كبيرة أو جهاز تصنيع فتؤخذ العينه بوسيلة معينه بحيث تكون نظيفه ومصنوعه من الحديد غير قابل للصدأ – الالومنيوم – النيكل أو الزجاج .

٢ – يجب أن تؤخذ عينات الدهن الصلب علي الاقل علي بعد ٢ بوصة من جدار الوعاء الكبير وعلي بعد واحد بوصه من الوعاء الصغير .

٣ – في حالة الزيت فانه يجب تنظيف فوهة الوعاء بقطعة قماش نظيفة مبلله بالاسيتون ثم يصب كميه من الزيت ثم تؤخذ بعد ذلك العينه .

٤ – بعد أخذ العينات من العبوات أو أجهزة التصنيع يجب أن توضع في أوعية زجاجية نظيفه ويجب عدم إستعمال غطاء لها مصنوع من البلاستيك أو تغطي بالورق وأن تحمي العينات من الحرارة والهواء بقدر الامكان .

ويجري تنظيف الاوعيه لوضع العينات بان تسخن أولا لذوبان أي دهن من التقدير السابق ويهمل ثم تغسل بمذيب عضوي ويفضل إثير البترول إذا كان الرقم اليودي للدهن ١٠٠ أو أقل وما عدا ذلك يستعمل الاسيتون يحضر محلول منظف (١٪) ويفضل المنظف من النوع الذي لا يترك متبقي علي الزجاج ويوضع هذا المحلول في حمام مائي ثم يسخن تقريبا للغليان ويستعمل هذا المحلول المنظف في تنظيف جميع الوصلات الزجاجيه والسدادات باستعمال الفرشاه ثم تنقع داخله وتترك لمدة نصف ساعة – ثم تغسل بماء الصنبور ثم بالماء وتجفف باستعمال فرن علي درجة ١٠٠ مْ .

الطريقة Procedure :

يجب أن تذكر درجة الحرارة المستخدمة والمقصود بها درجة الدهن المسخن وليس درجة حرارة الحمام المستخدم ويجب التحكم في درجة الحرارة أثناء التسخين وإمرار الهواء في العينه وكذلك النظافه العاليه ومنع الشوائب مع توخي الحرص الشديد وإلا تصبح النتائج غير دقيقه . وفي حالة حدوث أي خطأ فان النتائج باستعمال هذه الطريقة تكون أقل من القيم المتوقعه .

١ – يوضع في كل أنبوبة (٢.٥ × ٢٠ سم٢) ٢٠ سم زيت أو دهن مصهور ويبين علي الانبوبة علامة لارتفاع ٢٠ سم .

٢ – توضع أحد الانابيب في الحمام الذي سبق تسخينه إلي درجة الحرارة المطلوبة ثم توضع أنبوبة الهواء Aeration Assembly ثم توصل بنظام مرور الهواء تقفل الانبوبة الاخري وتحفظ علي درجة حرارة منخفضة حتي يبدأ تسخينها ويبدأ نظام التسخين طبقا للمعلومات التالية :

وقـت الحفـــظ	فترات التباعد Spacing of tubes
صفر - ١٦ ساعه	تترك علي حده لمدة ١ ساعة
١٦ - ٣٢ ساعه	تترك علي حده لمدة ٢ ساعة
٣٢ - ٥٠ ساعه	تترك علي حده لمدة ٣ ساعة
أكثر من ٥٠ ساعه	تترك علي حده لمدة ٤ ساعة

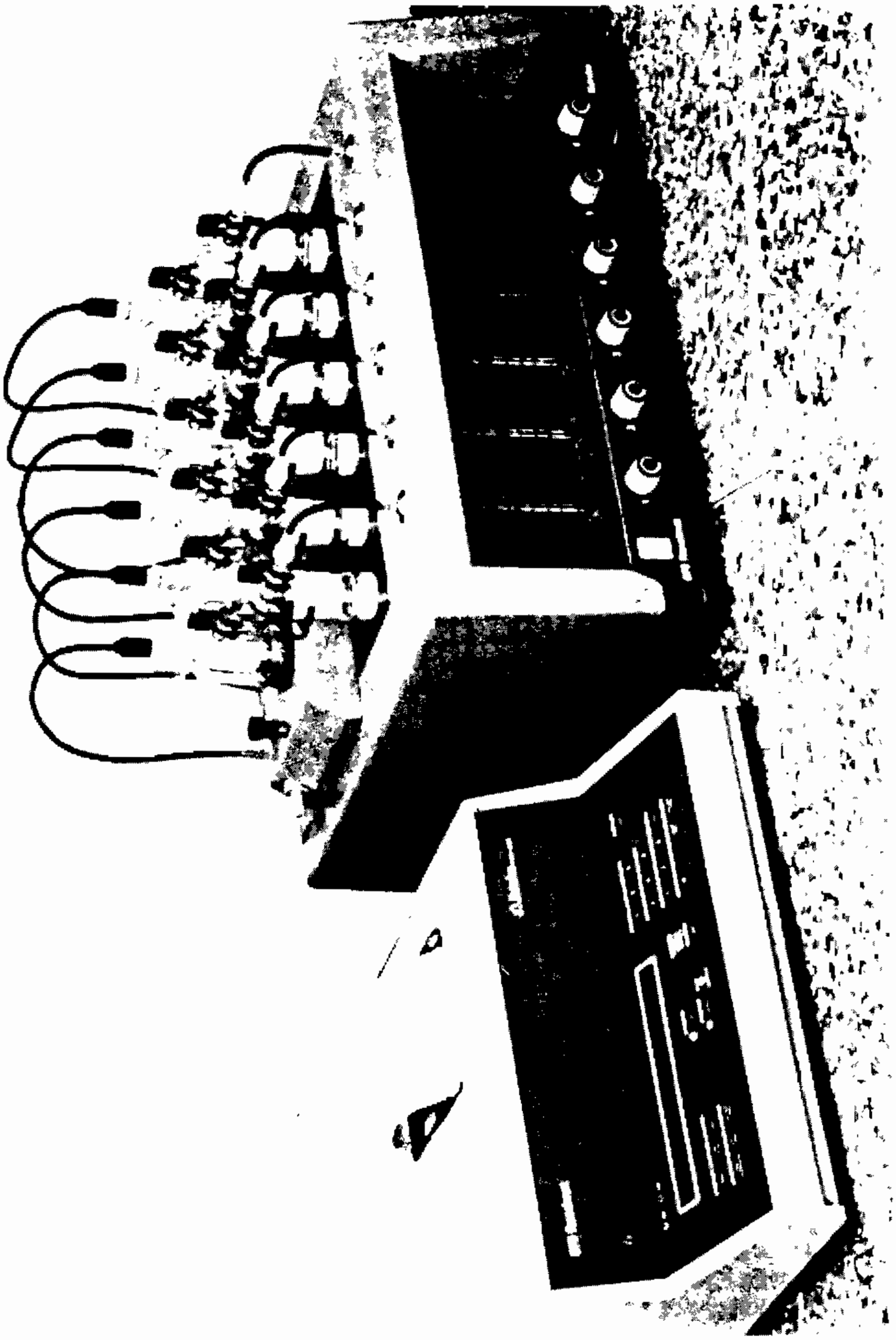
٣ - تترك محتويات الانابيب عند درجات الحرارة المعينه ويجري الكشف باستمرار علي الانابيب للتأكد من مرور الهواء كما يجب .

٤ - تستمر عملية التسخين والتهوية حتي يصل رقم البيروكسيد إلي النقطه التي تطابق تزنخ الدهن وهي تبعا للطرق القياسية ١٠ ميللمكافيء/ كيلو جرام دهن عمليا ونقطة النهاية تساوي ٢٠ ميللمكافيء/ كيلو جرام في حالة دهن الحيوان غير المهدرج ، ٧٥ - ١٢٥ للزيوت والدهون المهدرجة الاخري وأنه يمكن استمرار عملية التسخين والتهوية بدون إنقطاع حتي نقطه النهاية End point واذا لم يكن ذلك مستطاعا فانه يجب حفظ الانابيب مباشرة تحت برودة عاليه Chilled بعد رفعها من الحمام وتبقي علي هذه الحالة حتي يستأنف التسخين مرة اخري .

٥ - عند الوصول الي نقطة النهاية يقدر رقم البيروكسيد للعينه ويعبر عن الثبات بعدد الساعات (بعد تقريبها الي أقرب ساعه) اللازمه للوصول إلي رقم بيروكسيدي معين .

٦ - بعد إجراء الطريقة عدة مرات فانه بهذه الطريقه يمكن تحديد نقطة النهاية عن طريق شم رائحة الهواء الخارج من أنبوبة العادم Exhaust حيث تعطي دليل جديد لتحديد هذه النقطه ولكن نظرا لاختلاف الاشخاص في حساسية تحديد هذه الرائحة فأنه لا يمكن قبول الرائحة كصفة نهائية لتحديد نقطة النهاية .

يعمل جهاز الرانسيمات Rancimate علي نفس فكرة جهاز سويفت . يقدر هذا الجهاز مدي ثبات زيوت ودهون الطعام والمنتجات التي تحتوي علي نسبة عالية من الدهون مثل النقل Nuts وزبده الكاكاو ضد الاكسده Oxidation stability بسرعة وأوتوماتيكيا وبدقه عالية .



جهاز الرنسيمات

وتعتمد الفكرة الاساسية لهذا الجهاز علي إمرار تيار مستمر من اكسوجين الهواء (٣ - ٣٠ لتر/ ساعة) في عينات الزيت أو الدهن (جرامات قليله أو ملليمترات قليلة) عند درجة عالية (١٠٠ - ١٤٠مْ) حيث تبدأ Onset الاكسدة الانقسامية بسرعة Oxidative degradation وتنتج أحماض عضوية التي تنقل الي دوارق معيارية Measuring flasks حيث ترتبط Captured مع كمية من الماء ويكشف عنها عن طريق التوصيل الكهربائي Conductivity ويعرف الوقت الذي يمر من بداية الاختبار حتي ظهور تغير واضح في التوصيل الكهربائي بفترة الاعداد وهي خاصية تدل علي مقاومة Resistance عينه الزيت أو الدهن للتزنخ . ويمكن معرفة وقت الاعداد لعينات الزيت أو الدهن في خلال ساعات قليلة إلي بداية الاكسده الانقساميه.

ويستخدم هذا الجهاز فيما يلي :

١ - معرفة مدي كفاءة المواد المضادة الاكسدة المضافة إلي الاغذية بسرعة .

٢ - معرفة الظروف المناسبه لحفظ وتداول الزيوت والمنتجات الدهنيه عن طريق نتائج التحليل الدقيقة .

٣ - تأثير إنتشار الاكسوجين خلال مواد عديده معبأه Packaging materials تستخدم في تعبئة الأغذية المصنعه .

٤ - تقييم عمليات تكرير Refining الزيوت وعمليات التصنيع الاخري للحصول علي الزيت المكرر .

٥ - يمكن معرفة الوقت اللازم لتخزين وتصنيع المواد ذات نوعيه رديئه Poor quality.

٦ - وضع المواصفات الدقيقة Decision criteria عند شراء الزيوت والمواد الدهنية الخام Raw وكذلك المواد المصنعه والوسيطه Intermediate and Finished .

وفيما يلي خطوات تشغيل الجهاز :

١ - يوضع عدد ٦ عينات في مخابير التفاعل .

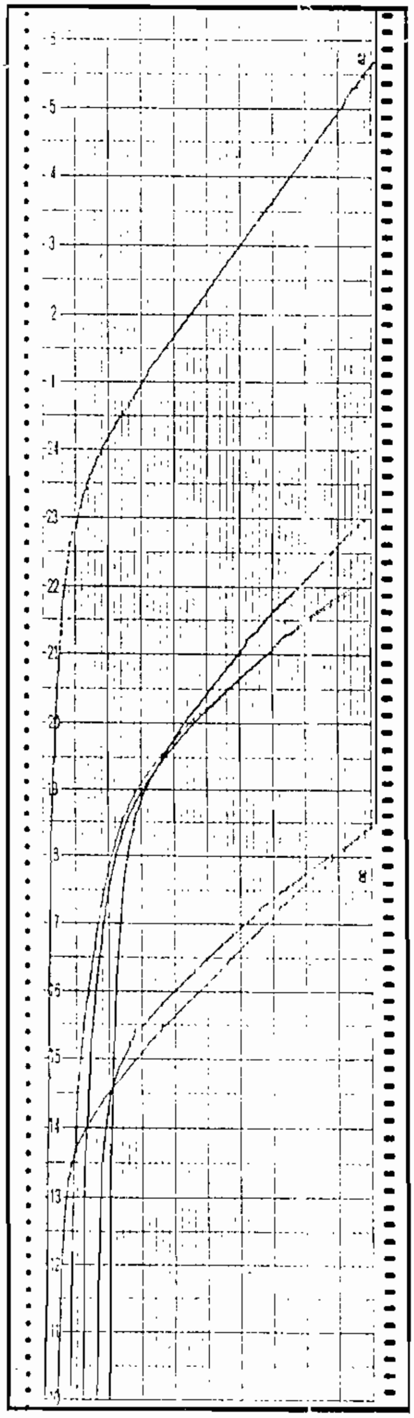
٢ - توضع العينات داخل غرفة Compartment التي تسخن بطريق غير مباشر بواسطة حمام زيتي مزود بثروماستات .

٣ - تشغيل مضخة لامرار تيار قليل من الهواء .

٤ - يقدر تعرض Proneness العينات للتزنخ أوتوماتيكيا - والشكل في الصفحة التاليه يبين

بدقة فترات الاعداد لعينات زيوت مختلفة والتي تبين نوعيات منها رديئه bad ومنها جيده جدا Verg good .

يختلف جهاز الرانسيمات عن جهاز ڤاريوج في أن الأكسوجين في الجهاز الثاني يستنزف باستمرار Progressively depleted علي العكس من جهاز الرانسيمات الذي يمرر خلال العينه تيار مستمر من الهواء وبالتالي فهو يشابه طرق التخزين العادية .


عينة زيت لها درجة
ثبات عالية ضد الأكسدة
عينات من زيوت لها درجة
ثبات متوسطة ضد الأكسدة
عينات من زيوت لها درجة
ثبات منخفضة ضد الأكسدة

رقم البيروكسيد

Peroxide value

يعتبر تقدير رقم البيروكسيد كمقياس للبيروكسيدات الموجودة فى الزيت – ويلاحظ أثناء التخزين أن تكوين البيروكسيدات يكون بطيئا فى أول الامر خلال فترة الاعداد Induction period وهى تختلف فمن أسابيع قليلة الى عدة أشهر تبعا لنوع الزيت أو الدهن ، درجة الحرارة ... الخ ويقدر رقم البيروكسيد حجميا وهى تعتمد على تفاعل يوديد البوتاسيوم فى محلول حامضى مع الاكسوجين المرتبط يعقبه معايرة اليود المنفرد بواسطة ثيوكبريتات الصوديوم – وعادة يستخدم خليط من الكلوروفورم مع حامض الخليك كمذيب .

التعريف :

هو عدد الملليمكافئات من البيروكسيد الموجود فى ١ كيلو جرام زيت أو دهن .

الكيماويات المطلوبه :

حامض خليك – كلوروفورم – يوديد بوتاسيوم – ثيوكبريتات صوديوم – دليل النشا .

الزجاجيات المطلوبة :

دورق مخروطى سعته ٢٥٠ سم٣ – ماصه ١ سم٣ – سحاحه .

طريقة العمل :

١ – يوزن ٥ جم ± ٠.٠٥ جم من العينه فى دورق مخروطى ٢٥٠ سم^{٣} ثم يضاف ٣٠ سم٣ من محلول حامض خليك – كلوروفورم (٣ + ٢ ، حجم / حجم) .

٢ – يحرك الدورق حركه دورانيه حتى تذوب العينه ويضاف (١سم^{٣} من محلول يوديد بوتاسيوم مشبع بواسطة ماصه دقيقة ويترك المحلول لمدة دقيقة بالضبط مع الرج من حين لاخر ثم يضاف ٣٠ سم^{٣} ماء مقطر .

٣ – يعاير المخلوط بواسطة ٠.٠١ع ثيوكبريتات صوديم – تضاف الثيوكبريتات تدريجيا مع الرج الشديد الثابت لمحتويات الدورق وتستمر عملية المعايرة حتى يكاد يختفى اللون الأصفر – يضاف ٠.٥ سم^{٣} نشا (١٪) وتكمل عملية المعايرة مع الرج الشديد بالقرب من نقطة النهاية لانفراد اليود من طبقة الكلوروفورم وتضاف الثيوكبريتات نقطة نقطة حتى يختفى اللون الازرق .

٤ – اذا كانت كمية الثيوكبريتات التى أستخدمت فى المعايرة أقل من ٠.٠٥ سم٣ يعاد مرة اخرى التقدير باستعمال ثيوكبريتات قوتها ٠.٠٠١ ع .

٥ – يجرى عمل بلانك يوميا على الجواهر الكشافه ويجب أن يكون حجم المعايرة للبلانك لا يزيد عن ٠.١ سم٣ من ٠.٠١ ع محلول ثيوكبريتات الصوديوم .

الحساب : يحسب رقم البيروكسيد من المعادله الاتية :

$$\text{رقم البيروكسيد (ملليمكافئات / كيلو جرام دهن)} = \frac{\text{حجم الثيوكبريتات} \times \text{ع} \times ١٠٠٠}{\text{وزن العينة}}$$

حيث أن ع = عيارية الثيوكبريتات .

تكون أرقام البيروكسيد فى حالة الزيوت المستخلصه حديثا Fresh أقل بدرجة كبيرة من ١٠ ملليمكافئات / كيلو جرام ويظهر الطعم المتزنخ بدرجة واضحة عندما يكون رقم البيروكسيد يقع ما بين ٢٠ – ٤٠ ملليمكافئات / كيلو جرام وتوجد طريقه أخرى تعطى نتائج سريعه وفيما يلى خطوات هذه الطريقه التى يجب أن تجرى بعيدا عن الضوء .

١ – يوزن ١ جم أو أقل من زيت أو دهن فى أنبوبة نظيفة جافه ثم يضاف ١ جم مسحوق يوديد بوتاسيوم ، ٢٠ سم٣ من خليط مذيب (٢ حجم حامض خليك ثلجى + ١حجم كلوروفورم) .

٢ – توضع الانبوبة فى حمام مائى يغلى بحيث يغلى السائل فى خلال نصف دقيقة وتظل للغليان الشديد لمدة لا تزيد عن نصف دقيقه وتنقل المحتويات بسرعة الى دورق يحتوى على ٢٠سم٣ من محلول يوديد بوتاسيوم (٥٪) وتغسل الانبوبة مرتين بواسطة ٢٥ سم٣ ماء .

٣ – تعاير محتويات الدورق بواسطة ٠.٠٠٢ مولر ثيوكبريتات صوديوم فى وجود النشا .

٤ – يجرى بلانك تحت نفس الظروف .

٥ – وعادة يعبر عن رقم البيروكسيد بعدد المليمترات من ٠.٠٠٢ع ثيوكبريتات صوديوم لكل جرام عينه وعند ضرب هذه القيمة فى ٢ فإن الرقم الناتج يكون مساويا لعدد المليمكافئات من البيروكسيد لكل ١ كيلو جرام عينه .

وهناك أخطاء errors تحدث عند تقدير رقم البيروكسيد مرجعها إلى أن اليود المنفرد يمتص بواسطة الروابط غير المشبعه فى الاحماض الدهنيه وعلى العكس من ذلك إنفراد اليود من يوديد البوتاسيوم بواسطة الاكسوجين الموجود فى المحلول الذى يجرى معايرته .

اختبار كريس

Kreis test

يشمل هذا التفاعل على إنتاج لون أحمر عند تفاعل الفلوروجليسينول مع الدهن المؤكسد فى محلول حامضى . واللون الناتج يتناسب طرديا مع الزيادة فى إنتاج الدهيد الايبيهيدرين Epihydrin aldehyde أو الدهيد حامض المالونيك malonaldehyde من الدهن أو الزيت .

الإختبار الوصفى :

١ – يرج ١٠ سم٣ زيت أو دهن مصهور بشده مع ١٠ سم٣ من محلول ١ .٠٪ محلول فلوروجليسينول فى الاثير و ١٠ سم٣ حامض هيدروكلوريك مركز لمدة ٢٠ ثانيه . ثم تترك الانبوبة لمدة ١٠ دقائق مع ملاحظة اللون المتكون .

٢ – يدل ظهور لون قرمزى على بداية حدوث incipient التزنخ – إذا ما خفف الزيت بنسبة ١ : ٢٠ بواسطة الكيروسين ومازال الاختبار موجب بالنسبة للتزنخ فهذا يدل على الطعم والرائحة الغير مقبوله .

الإختبار الكمى :

١ – يوزن ٣ جم زيت أو دهن مصهور فى أنبوبة إختبار – يضاف ١ سم٣ من محلول فلوروجليسينول (٥ .٠٠٪ . وزن / حجم فى كحول أمايل) ويرج بشده لمدة دقيقة .

٢ – يضاف ٢ سم٣ من محلول يحتوى على ١٠ جم ثلاثى كلورو حامض خليك مذابا فى ٢٨ .٣ سم٣ خلات أمايل وتغمر الانبوبة فى حمام مائى على درجة ٤٥ْم لمدة ١٥ دقيقة مع الرج المستمر .

٣ – ترفع الانبوبة من الحمام المائى وتخفف فى الحال بواسطة ١٠ سم٣ من محلول مثلج ناتج من تخفيف ١ حجم من ثلاثى كلورو حامض الخليك السابق ذكره مع ٢ حجم من خلات أمايل .

٤ – تقارن الكثافة اللونية فى الحال باستخدام Lovibond وتسجل أرقام وحدات الزجاج الاحمر .

٥ – يجرى بلانك فى نفس الوقت باستخدام خلات أمايل بدلا من محلول الفلوروجليسينول .

٦ - يحسب رقم كريس من المعادلة

$$T \quad \frac{R - RI}{LC}$$

حيث :

R = أرقام وحدات الزجاج الاحمر للعينه .

RI = أرقام وحدات الزجاج الاحمر للبلانك

L = طول الخليه (سم) .

C = تركيز الزيت (جم / سم) للمحلول النهائى .

وقد وجد أن رقم T لدهن الزبد الحديث يساوى تقريبا ٢٠ .

اختبار شنال Schaal test

يقدر هذا الاختبار مقاومة الزيوت والدهون ضد الاكسدة ويشمل على تسخين ٥ - ١٠٠ جم من العينه فى طبق مفتوح Open dish داخل فرن مضبوط على درجة حرارة ٦٣ْ + ٥ر٠ْم أو ٧٠ مْ حتى يبدأ التزنخ . وتفحص العينات على فترات منتظمه Regular intervals يوميا أو أسبوعيا معتمدا على مدى قابلية الدهن للاكسده ويحدد الزمن الذى عنده بدأ الاحساس ببداية التزنخ بخاصية الشم taste panel وبطبيعة الحال إذا كان الدهن له رائحة تزنخ فلا يمكن استخدام هذا الاختبار لمعرفة مدى مقاومة الزيت أو الدهن للتأكسد .

رقم الانيزيدين Anisidine test

تعتبر البيروكسيدات الناتجه من الزيوت المؤكسده بانها مركبات وسطيه حيث تنكسر Decompose وتعطى مركبات كربونيلية مختلفة ومركبات أخرى . ويزداد التكسير برفع درجة الحرارة وبالتالى ينخفض رقم البيروكسيد بتسخين الزيت فى غياب الهواء أو الاكسوجين والجدير بالذكر أنه تتم عمليات التبييض Bleaching وإزالة الرائحة deodorisation فى مراحل تكرير الزيت الخام فى غياب الهواء لمنع عمليات الاكسده .

ويلاحظ أن نواتج تكسير البيروكسيد تؤدى إلى زيادة الاكسدة أو انها تتكسر أو تتفاعل مرة اخرى لتعطى مركبات جديده لها رائحة غير مقبوله .

ويعرف رقم الانيزيدين على أنه يعادل ١٠٠ مرة إمتصاص محلول ناتج من تفاعل ١ جم زيت أو دهن فى ١٠٠ سم٣ مخلوط من المذيب والبارا أنيزيدين عند طول موجه ٣٥٠ نانومتر باستخدام خليه ١ سم٣ .

ويقدر رقم الانيزيدين للدهن بمعاملته بواسطة الجوهر الكشاف بارا أنيزيدين فى محلول الأوكتان المشابه Iso - Octane وتقدر تركيزات نواتج التفاعل إسبكتروسكوبيا على طول موجه ٣٥٠ نانومتر – وهذا الاختبار يقدر تركيز الألدهيدات وبصفه أساسيه ألدهيدات غير المشبعه 2 - alkenals الموجوده بالزيت .

ولتنقية بلورات الانيزيدين يتم بذوبان ٤٠ جم بارا أنيزيدين فى واحد لتر ماء مقطر على درجة ٧٥ْم ثم يضاف ٢٠ جم فحم نباتى ، ٢ جم كبريتيت صوديوم الى المحلول الذى يرج بعد ذلك لمدة ٥ دقائق ويرشح ويبرد المترشح على درجة الصفر المئوى ويترك على هذه الدرجة لمدة لا تقل عن ٤ ساعات . ثم تفصل البلورات بالترشيح ويفضل أن تتم هذه الخطوة تحت تفريغ ثم تغسل بكميات قليلة من الماء درجة حرارتها صفر ثم تجفف فى مجفف تحت تفريغ – ويجب إستخدام البلورات قبل حدوث أى تغير فى اللون ولونها الطبيعى هو سمنى Cream ويجب حفظها على درجة صفر – ٤ مْ فى زجاجات غامقه ولا تعرض للضوء وهذه البلورات سامه ويجب أن لا تلامس الجلد مباشرة .

تحضير الجوهر الكشاف :

يذاب ٠.٢٥ جم بارا أنيزيدين فى ١٠٠ سم٣ حامض خليك ثلجى يحفظ هذا الجوهر الكشاف بعد تحضيره فى زجاجات بنيه اللون وعلى درجة حرارة أقل من ٥.٠ مْ ويستخدم فقط فى خلال ٣ أيام من التحضير ويجب أن تكون العينات والجواهر الكشافه جافه وبصفه خاصة حامض الخليك ويمكن إزالة آثار الماء منه باضافة أندريد حامض الخليك .

طريقة العمل :

١ – يوزن ٠.٥ جم من عينة الزيت أو الدهن الجاف فى دورق معيارى سعة ٢٥ سم٣ ويملأ هذا الدورق الى العلامة بواسطة الاوكتان المشابه الذى له إمتصاص قيمته صفر عند الاطوال الموجيه ٣٠٠ – ٣٨٠ نانومتر .

٢ – يؤخذ ٥ سم٣ من هذا المحلول فى أنبوبة إختبار لها سداده وتجهز أنبوبة أخرى محتوية على ٥ سم٣ أوكتان المشابه ثم يضاف اليها ١ سم٣ من الجوهر الانيزيدين تقفل الانبوبتين

وترج جيدا . وتترك فى الظلام على درجة ٢٥م ± ١م لمدة ٨ دقائق تقريبا – تنقل المحاليل الى خلايا جهاز الاسبكتروفوتومتر وبعد ١٠ دقائق بالضبط من خلط الجوهر الانيزيدين مع المحلول المختبر تقدير قيمة الامتصاص لهما .

٣ – يحسب رقم الانيزيدين من المعادله التالية :

$$\text{رقم الانيزيدين} = \frac{\text{٢٥ (١.٢ ب – أ)}}{\text{جـ}}$$

حيث :

أ = إمتصاص محلول الزيت أو الدهن

ب = إمتصاص نواتج الزيت أو الدهن مع الجوهر الكشاف .

جـ = وزن الزيت أو الدهن (جم) الموجود فى ٢٥ سم^{٣} من المحلول .

والمعامل ١.٢ المذكور فى المعادله ناتج من أن محلول الزيت أو الدهن مع الانيزيدين قد خفف باضافة محلول الجوهر الانيزيدين فى حين لم يخفف محلول الزيت أو الدهن نفسه .

رقم التوتوكس Totox Value

يعتمد هذا الاختبار على استخدام ارقام البيروكسيد والانيزيدين معا لحساب رقم الاكسده الكلى (Total Oxidation (Totox ويحسب هذا الرقم من المعادلة :

رقم الاكسدة الكلى = ٢ (رقم البيروكسيد) + رقم الانيزيدين

وفى حالة النوعية الجيدة من الزيت يكون رقم الانيزيدين لها أقل من ١٠ – وفى حالات قليلة للزيوت أو الدهون يكون لها أرقام محسوسه لكل من أرقام البيروكسيد والانيزيدين وهذا يدل على بداية فى زيادة التلف .

رقم حامض الثيوباربيتيوريك

Thiobarbituric acid number (TBA)

تظهر وتزداد الصبغة الحمراء الناتجة من تفاعل حامض الثيوباربيتيوريك مع الليبيدات المؤكسدة مع زيادة التزنخ الاكسيدى ويعتبر إختبار TBA كمقياس لمدى التلف سواء لليبيدات المستخلصة وغير المستخلصة من مصادر غذائية وعلى ذلك يستخدم هذا الاختيار بصفه عامة للأطعمة الدهنية بالاضافة الى الزيوت والدهون النقية .

ويجرى التفاعل بتسخين اللحم Flesh مع جوهر كشاف TBA واستخلاص اللون بواسطة خليط من الكحول والبيريدين - كما يجرى التفاعل مع مستخلصات ثلاثى كلوروحمض خليك للسمك - ويعبر عن النتائج بأنها عبارة عن الدهيد حامض المالونيك باستخدام منحنى قياسى يحضر باستخدام ١ و ١ و ٣ و ٣ رباعى ايثوكسى بروبان والذى يعطى الدهيد حامض المالونيك بالتحليل الحامضى ، ويعرف رقم TBA بأنه عدد ملليجرامات الدهيد حامض المالونيك / كيلو جرام وفيما يلى خطوات تقدير رقم TBA فى الزيوت والدهون .

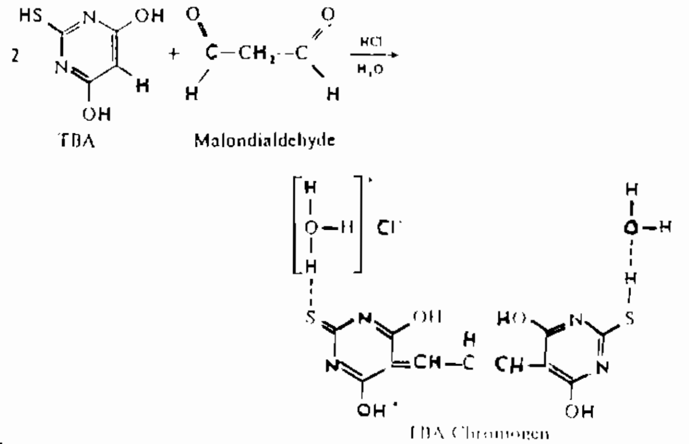
١ - تؤخذ وزنه من الزيت أو الدهن (٠.٥ جم) وتخلط جيدا مع جوهر كشاف حامض الثيوباربيتيوريك (٥ سم^3 - ٠.٣ ٪ مذابا فى ٩٠٪ حامض خليك) .

٢ - تمزج مكونات العينه جيدا وتسخن فى حمام مائى لمدة نصف ساعة .

٣ - يجرى بلانك باضافة جميع الجواهر الكشافه بدون الدهن أو الزيت .

٤ - بعد التبريد تقاس كثافة الامتصاص عند طول موجة ٥٣٨ نانومتر .

وفيما يلى ميكانيكية حدوث التفاعل :



وفيما يلى تقييم للطرق السابق ذكرها لتقدير تزنخ الليبيدات :

تتكون الهيدروبيروكسيدات عند تخزين الدهون الموجودة فى الاغذية وتنكسر تدريجيا ويعتبر اختبار الحديد اكثر الطرق اللونيه (الفوتومترية) للكشف عن الاكسده الذاتيه ونظرا لتداخل مكونات الاغذية مع البيروكسيدات فانها تتحلل بسرعة جدا . كما أن تكسير البيروكسيدات الناتجه من حامض اللينوليك أو اللينولينيك تعطى بجانب مركبات أخرى مركبات تحتوى على روابط زوجيه ثنائيه متبادله وعلى ذلك فتعتبر طريقة تقدير الامتصاص عند طول موجه ٢٣٤ فى بعض الحالات من أكثر الطرق حساسية للكشف عن بداية أكسدة الليبيدات .

تعتبر عملية تقدير المركبات الكربونيلية الناتجه من الاكسدة الذاتية غير دقيقة فى وجود البيروكسيدات وقد وجد أن طريقة تقدير الهبتانال أكثر الطرق حساسية الا أنه عند استخدام الاحماض فى التقدير فانها تؤدى الى تكوين مجاميع كربونيل إضافيه من البيروكسيدات وبهذه الطريقة فان النتائج تكون أعلى من القيمة الحقيقية والجدير بالذكر أنه يتكون آثار من المركبات الكربونيلية من الدهن المتزنخ .

وتعتبر طرق الانيزيدين وكريس غير مناسبة للكشف عن أكسدة الليبيدات لانها غير حساسه وغير متخصصه وبالنسبه لطريقة حامض الثيوباربيتيوريك فهناك مقترحات عديدة لزيادة حساسية هذا الاختبار منها إضافة أيونات الحديديك التى تتفاعل مع الهيدروبيروكسيدات ويتلاشى تأثيرها (J, Biol. Chem. 250: 8814 1975) ويرجع الارتفاع فى قيم إختبار حامض الثيوباربيتيوريك عن الارقام الحقيقية الى انكسار Breakdown البيروكسيدات التى تتفاعل مع TBA هذا بالإضافة الى أنه تحت الظروف القاسية Drastic التى يجرى عليها التفاعل يحدث زيادة فى معدل الاكسدة الذاتية وبالتالى زيادة فى كمية البيروكسيدات ويتبعها زيادة فى المركبات الكربونيليه .

الفصل الرابع

مشتقات الجلسريدات الثلاثية

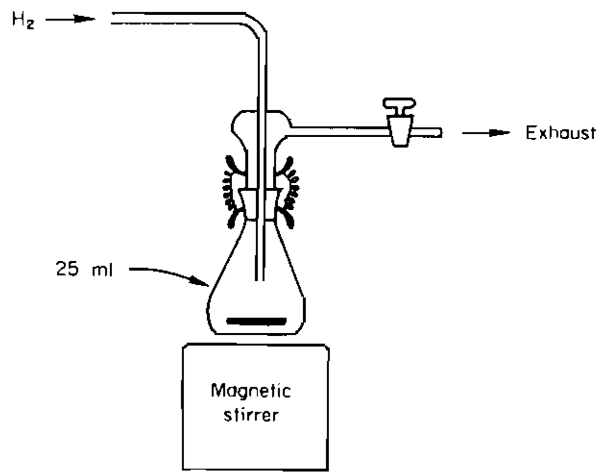
Triglyceride derivatives

تحتوى الجلسريدات على ثلاث مجاميع فعاله وهى الأماكن الفعالة Potential Sites لتكوين المشتقات : الروابط الزوجية - روابط الاستر - مجاميع الهيدروكسى - الايبوكسى - الكيتونيه .

أولا : التفاعلات مع الروابط الزوجية Reaction at double bonds

أ - الهدرجة Hydrogenation

يمكن بسهولة تحويل الجلسريدات الثلاثية غير المشبعة الى جزيئات مشبعه تماما بواسطة الهدرجة . وهذا التفاعل يحدث كميا ويمكن إجراؤه على درجة حرارة الغرفة فى وجود البلاتين كعامل مساعد ذو النشاط العالى وفيما يلى الخطوات التى تجرى فى المعمل لهدرجة الجلسريدات الثلاثية .



١ - يذاب ١ - ٥٠ مجم من عينة الجلسريدات الثلاثية فى ٣ - ٥سم٣ dioxane حديث التقطير ويوضع المخلوط فى دورق ذو سعة ٢٥ سم٣ ومصنفر كما فى الرسم (صفحة ١١١) .

٢ - يضاف ١٠ - ٢٠ مجم من أكسيد البلاتين (Adam's catalyst) ويوضع مقلب مغناطيسى مغطى بالتيفلون Teflon ثم يغطى الدورق .

٣ - يمرر تيار من الهيدروجين مع قفل الصنبور للحصول على ضغط (١ - ٣ رطل على البوصه المربعه) موجب أثناء التفاعل .

٤ - يبدأ التقليب ولمدة نصف ساعه - ويدل على أن التفاعل يسير على ما يرام هو تحول لون العامل المساعد من البنى الغامق الى الاسود وأخيرا يكون عصى طويله Long Strands .

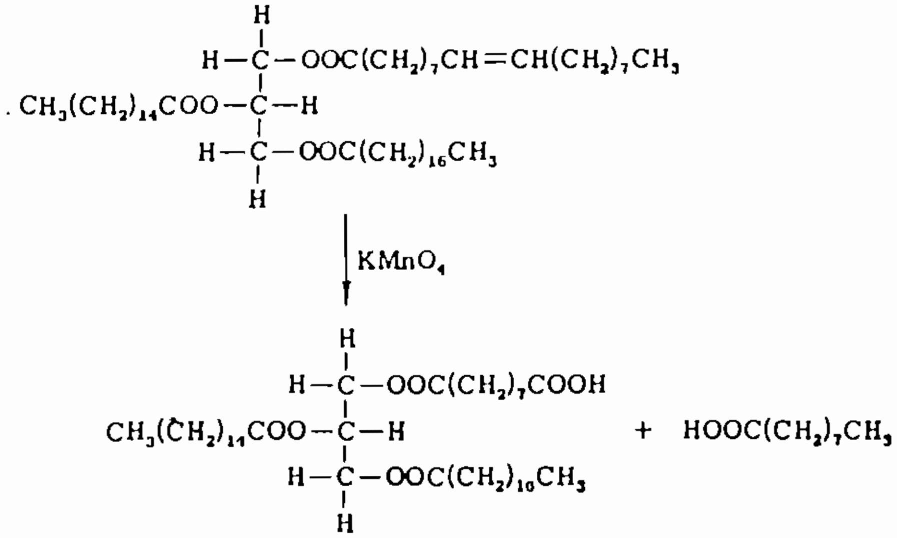
٥ - بعد إنتهاء التفاعل يضاف ١٠ سم٣ كلوروفورم ثم تجرى عملية الترشيح للتخلص من العامل المساعد المستنزف Spent - يغسل المترشح بواسطة الماء - يجفف فوق كبريتات صوديوم لا مائية - يرشح - يبخر المحلول للحصول على الجلسريدات الثلاثية المهدرجه .

ويجب أن يكون تركيز الجلسريدات الثلاثية غير المشبعة منخفضا حتى لا تنفصل بلورات الجلسريدات الثلاثية من المحلول قبل أن يحدث لها هدرجة كاملة - ويلاحظ أن وجود مذيبات كحوليه تحدث فى بعض الاحيان تبادل تكوين الاستر ولذلك يجب عدم إستخدام هذه المذيبات وللتأكد من حدوث الهدرجة الكاملة للروابط غير المشبعة فانه يجرى التحليل بواسطة جهاز الكروماتوجرافى الغازى لاسترات الميثايل المشتقه منها وهناك بعض الدهون الطبيعيه وبصفة خاصة الزيوت البحريه وزيوت بنور العائلة الصليبية Cruciferae تحتوى على مواد تسمم العامل المساعد والتى تعوق عملية الهدرجة بدرجة ملحوظة .

ب- الاكسدة بواسطة البرمنجنات

Permanganate oxidation

تجرى عملية أكسدة للدهون الطبيعية بواسطة برمنجنات البوتاسيوم لتقدير المحتوى وأنواع الجلسريدات التالية : SSS, SSU, SUU, UUU ونظريا فأن البرمنجنات تقوم بفتح Cleave كل رابطة زوجية فى الجلسريد الثلاثى وتكوين مجموعتين كربوكسيليتين :



تتأكسد الجلسريدات الثلاثية التى تحتوى على أحماض دهنية غير مشبعة الى جلسريدات للأحماض ثنائية الكربوكسيل – وعلى ذلك فى حالة مخلوط الجلسريد الثلاثى الذى يحتوى ١٨:٠ و ١٨:١ و ١٨:٢ و ١٨:٣ تتحول الى خليط من SSS,SSA, SAA, AAA حيث تفصل بواسطة طرق كروماتوجرافية مختلفة – وعمليا تعتبر الاكسدة بالبرمنجنات هى طريقة نصف كمية Semi quantitative وذلك للأسباب الآتية :

١ – لا يحدث التفاعل كاملا حيث تترك بعض الروابط الزوجية غير مؤكسدة .

٢ – يحدث تحلل فى بعض الاحيان للروابط الاستيريه .

٣ – تتكون نواتج ثانوية من التفاعل تحتوى على مجاميع إستر إضافية ومركبات غير معروفة متعادلة .

٤ – تحدث أكسدة ثانوية للسلسلة الكربونية (Over oxidation) وتتكون أحماض ثنائية الكربوكسيل تحتوى على ذرات كربون أقل بمقدار ذرة أو أثنين عن المتوقع .

توجد ثلاث طرق أساسية لاكسدة الجلسريدات الثلاثية غير المشبعة بواسطة البرمنجنات وهى :

١ – طريقة Hilditch حيث يستخدم البرمنجنات فى محلول أسيتون (Hilditch and Williams. 1964

٢ – طريقة Kartha حيث يستخدم البرمنجنات فى محلول اسيتون / خليك (Kartha, 1953) .

٣ – طريقة Von Rudloff حيث يستخدم برمنجنات/ برأيودات فى محلول كحول البيوتايل الثلاثى (Von Rudloff, 1956) .

وفى طريقة Hiditch والتى تعتمد على أكسدة الجلسريدات الثلاثية الطبيعية فى محلول أسيتون والتسخين تحت مكثف عاكس باستخدام مسحوق البرمنجنات – تعتبر نصف كمية ويحدد إستخدامها كما يلى :

أ – التفاعل غير كامل حيث أن العينة المؤكسدة لها رقم يودى يقع ما بين ٢ – ٨.

ب – يحدث تحلل مائى بدرجة محسوسه أثناء الاكسدة .

ج – يحدث أيضا أكسدة زائدة نتيجة لكسر الروابط الزوجية .

وقد وجد Kartha أنه يمكن تقليل التحليل المائى للروابط الاستر فى وجود كميه زائدة من حامض الخليك أثناء أكسدة الجلسريدات الثلاثية فى محلول أسيتون بواسطة البرمنجنات وعلى الرغم من ذلك فما زالت هذه الطريقة نصف كميه Semiquantitative كما أنه يتكون مجاميع إستر خلات فى حالة إستعمال حامض الخليك عند الاكسدة بالبرمنجنات بالاضافة الى وجود نواتج الاكسده لا تحتوى على مجاميع كربوكسيل حرة .

وقد وجد Rudloff أنه يمكن أن تتأكسد الروابط الزوجيه للجلسريدات الثلاثية فى كحول البيوتايل الثالث لبرأيودات الصوديوم المحتوى على كميات قليله من البرمنجنات – وفيما يلى خطوات طريقة أكسدة خليط الجلسريدات الثلاثية من الدهون الطبيعية :

١ – تذاب ٢٠ مجم من ثلاثى أوليين فى ٥ سم٣ tert-butanol وتضاف الى مخلوط ٥ سم٣ من محلول الاكسده (٢١ جم بيرأيودات صوديوم + ٢٥ سم٣ ٠,١ مول برمنجنات بوتاسيوم/ لتر) و ٤ سم٣ ماء فقط و ١ سم٣ محلول كربونات بوتاسيوم (٨مجم/ سم٣) و ١٠ سم٣ كحول بيوتايل ثالث .

٢ – يجرى تحريك مخلوط التفاعل لمدة ٢,٥ ساعه على درجة ٦٥ْم – يبرد تحت ماء الصنبور – ثم يمرر غاز الايثلين فى المخلوط حتى يختفى اللون القرمزى.

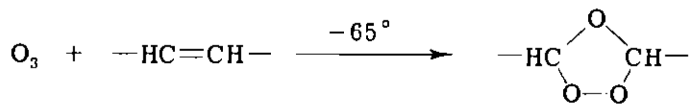
٣ – يبخر محلول الكحول البيوتايل الثالث تحت ضغط منخفض على درجة ٧٠ – ٨٠ْم – ثم يضاف ٢ – ٣ فقط من حامض HCl لجعل الوسط حامضى – يشبع المحلول المائى بواسطة كلوريد الصوديوم ثم تستخلص الجلسريدات المؤكسدة ثلاث مرات بواسطة كلوروفورم كل مره بـ ٢٥ سم٣ .

٤ – تفصل طبقة الكلوروفورم ويبخر المذيب فى وجود تيار من الهواء تفصل الاحماض أحادية الكربوكسيل قصيرة السلسلة والناتجة من عملية الاكسدة من العينة بتركها فى فرن تحت تفريغ على درجة ٨٥ْم لمدة ١٢ ساعة .

ويجب ضبط نسب الجواهر الكشافه المستخدمه فى الاكسدة تبعا لتركيب الأحماض الدهنيه فمثلا يحتاج حامض اللينوليك واللينولينيك كميه تعادل ٣ – ٥ مرات الكميه المطلوبه لحامض الأوليك .

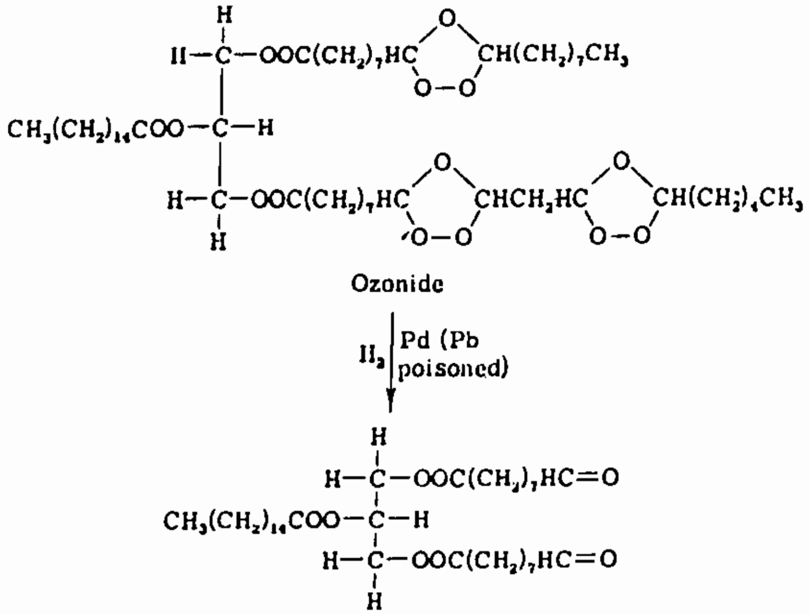
جـ . التفاعل مع الاوزون Ozonization

عند إضافة الأوزون الى الليبيدات غير المشبعه فانه ينتج أوزونيد الجلسريدات الثلاثية والتى يمكن فصلها باستخدام حامض السيليسيك تبعا لمحتواها من الاكسوجين . ويجرى التفاعل مع الأوزون عند درجة – ٦٥ْم باضافة محلول البنتان للعينة الى محلول البنتان للأوزون ثم تبخير جميع المذيب بعد ١ – ٣ دقيقة .



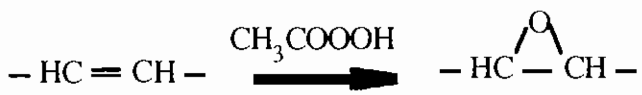
ويلاحظ أن هذا التفاعل غير كمى حيث أنه ينتج من تفاعل أوليات الميثايل مع الاوزون فى البنتان ٧٢,١٪ من الازونيد المتوقع – وهذا الانخفاض فى كمية الاوزونيد يرجع الى تكوين هيدروبيروكسيدات – أحماض – ألدهيدات وأيضا تغيير مواضع الاكيلات فى الاوزونيدات .

وتعطى أوزونيدات الجلسريدات الثلاثية كميا ما يطابقها من الألدهيدات بالهدرجة باستخدام العامل المساعد Lindlar – وتحول عملية الاوزون والهدرجة الجلسريدات الثلاثية غير المشبعه الأصليه الى مركبات ألدهيديه .



د . تكوين إيبوكسيد Epoxidation

تتفاعل الجلسريدات الثلاثية غير المشبعة مع حامض الخليك الفوقى وتعطى مشتقات إيبوكسيديه ذات درجة انصهار مرتفعه والتى يمكن فصلها بواسطة البلوره . وهذا التفاعل غير كمى حيث أنه يتكون ٦٥ – ٨٧٪ إيبوكسيد .



هـ . التفاعل مع البروم Bromination

يتفاعل البروم بالاضافة إلى الروابط الزوجيه للجلسريدات الثلاثية غير المشبعة وهذا يؤدى إلى إختلاف واضح فى معدل ذوبان المركبات البروميه أى تنفصل المشتقات ثنائية ورباعية

وسداسية البروم للأحماض الدهنية عن بعضها البعض بسهولة- والطريقة الشائعه الاستخدام للتفاعل مع البروم تشمل على الاضافه التدريجية للبروم مذابا فى الكلوروفورم للعينه المذابة فى الكلوروفورم على درجة حرارة - ١٠ مْ مع الرج الشديد حتى يأخذ محلول العينه لون أصفر ثابت - وأن ناتج التفاعل يكون كبيرا ولكن لا تتم الاضافة كاملا حيث أنه يحدث بجانب التفاعل الاضافى الى الروابط الزوجية تفاعل إستبدالى ويمكن حساب كمية البروم المأخوذة لتقدير الرقم اليودى وفيما يلى طريقة إدخال البروم الى الجلسريدات الثلاثية :

١ - توزن وزنة مناسبة من الجلسريد الثلاثى (١٠٠ مجم للعينات التى لها أرقام يوديه أعلى من ١٢٠ و ٢٠٠ مجم للعينات التى لها أرقام يودية ما بين ٦٠ - ١٢٠ ، ٥٠٠ مجم عندما يكون الرقم اليودى أقل من ٦٠) فى دورق وتذاب فى ١٠ سم٣ كلوروفورم .

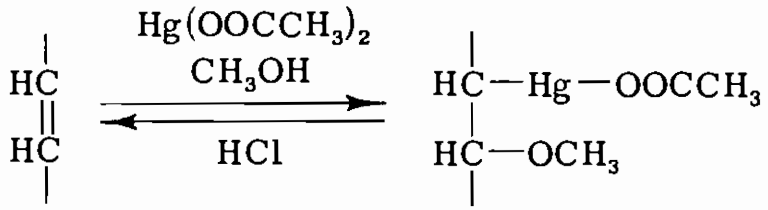
٢ - يضاف ٢٥ سم٣ من محلول Kaufmann (٢ . ٥ سم٣ بروم سائل يضاف الى ١٠٠٠ سم٣ محلول مشبع من بروميد الصوديوم فى كحول ميثايل مطلق) - فى حالة إنفصال الجلسريدات الثلاثية من الوسط السائل تضاف كميه مناسبة من الكلوروفورم للحصول على محلول متجانس .

٣ - يترك المخلوط فى مكان مظلم لمدة ٣٠ - ١٢٠ دقيقة معتمدا على الرقم اليودى ثم يضاف ١٥ سم٣ محلول يوديد بوتاسيوم ثم تعاير محتويات الدورق بواسطة الثيوكبريتات الصوديوم حتى يختفى اللون الازرق فى وجود النشا كدليل .

٤ - تستخلص الجلسريدات البروميه باضافة ٥٠ سم٣ ماء ثم الاستخلاص بالكلوروفورم . ويلاحظ أن النظام غير المشبع المتبادل conjugated وأيضا المحتوى على رابطه أسيتيلينه لا يحدث له ادخال كامل للبروم .

و . التفاعل مع الزئبق Mercuration

تتفاعل خلات الزئبق مع الروابط الزوجيه للجلسريدات الثلاثيه غير المشبعة لزيادة قطبية الجزيئات وهذا التفاعل يتناسب مع كمية الروابط غير المشبعة .



وتنفصل هذه المشتقات بالطرق الكروماتوجرافية تبعا لعدد ذرات الزئبق القطبيه وفيما يلى خطوات التفاعل مع الزئبق .

١ - تذاب ٥٠٠ مجم من خليط الجلسريدات الثلاثية فى ٢ سم^{3} بنزين . ثم يضاف ٥ سم^{3} من محلول خلات الزئبق (٢٠٪ زيادة) .

٢ - يسخن مخلوط التفاعل على درجة ٦٠ مْ لمدة ٣٠ دقيقه - يبرد ثم يبخر للجفاف - وتذاب نواتج الاضافة للجلسريد الثلاثى فى إثير البترول ويستخدم مباشرة فى التحليل .

وللوصول إلى إضافة كمية بالزئبق لزيت الكتان يستخدم كحول البروبانول أو حمض خليك بدلا من الميثانول لتكوين مشتقات بروبوكسى أو أسيتوكسى على التوالى .

ويمكن إسترجاع الجلسريدات الثلاثية الأصلية كميا من ملحها خلات الزئبق الناتج من الاضافة بالتفاعل مع حامض HCl مخفف .

ثانيا : تفاعلات روابط الإستر Reactions at ester linkages

تؤدى معظم التفاعلات مع روابط الاستر للجلسريدات الثلاثية الى إنفراد سلاسل الاحماض الدهنية من جزىء الجلسرول وهى بالتالى تغير جزئيا تركيب الجزىء الأصلى ومن نوعية الاحماض الدهنية المنفردة ويمكن بالتالى معرفة توزيعها على جزىء الجلسريد الثلاثى .

ثالثا : التفاعل مع مجاميع الهيدروكس - الإيبوكسى - الكيتونيه

إن تكوين مشتقات لمجاميع الهيدروكسى - الايبوكسى - الكيتونيه فى الجلسريدات الثلاثية لا يكون عادة ضروريا لفصلها حيث أن فصل مخاليط الجلسريدات الثلاثية يتم بسهولة بواسطة الادمصاص الكروماتوجرافى معتمدا على عدد الاحماض الدهنية المحتوية على إكسوجين لكل جزىء . وفى بعض الأحيان نجد أن مشتقات معينه لها أهمية خاصة فى ثبات أو تغيير الخواص الطبيعيه للجلسريدات .

أ - عملية الأستله : Acetylation

تتم أستله مجاميع الايدروكسيل بواسطة أندريد حامض الخليك - وهذا التفاعل يحدث كميا . وفيما يلى خطوات الأستله لايدروكسيل الاسيل والجلسريدات الثنائية .

١ - يوضع محلول يحتوى على ١ - ١٠٠ مجم عينه فى أمبوله ثم يبخر المذيب باستخدام تيار من النتروجين .

٢ - يضاف ٢.٥ سم^3 أندريد حامض الخليك و ٠.٥سم^3 بيريدين ثم تغلق الامبوله Sealed وتسخن لمدة ٣ ساعات على حمام مائى يغلى ثم تبرد .

٣ - تفتح الأمبولة Ampule ويبخر المذيب تحت ضغط منخفض - ثم يحدث توزيع لمخلوط التفاعل فى ٦٠ سم^3 من محلول كلوروفورم - ميثانول - ماء (٣٢ - ١٦ - ١٢ حجم/ حجم/ حجم) .

٤ - تنوب الجلسريدات المؤستله فى طبقة الكلوروفورم التى تفصل وتجفف فوق كبريتات صوديوم لا مائية .

٥ - بعد الترشيح يبخر المذيب ثم ينقى الناتج باستخدام TLC .

ب - تكوين إثيرات Trimethyl silyl ethers

تحول مجاميع الايدروكسيل الحرة للجلسريدات الثلاثية الايدروكسيلية والجلسريدات الثنائية إلى إثيرات ثلاثى ميثايل السيليل قبل التحليل بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى لزيادة درجة تطايرها ولمنع فقد الماء أو تحرك مجاميع الاسيل خلال التحليل وفيما يلى خطوات التفاعل .

١ - تذاب ١٠٠ ميكروجرام من ثنائى الأوليين فى ٢٠ ميكرولتر من هبتان و N - bis-n (trimethylsilyl) acetamide بنسبة ١٠ : ١ حجم / حجم .

٢ - بعد ١٠ دقائق يحقن حوالى ميكرولتر من ناتج التفاعل مباشرة الى GLC ويفضل إستخدام البيريدين عن الهبتان كمذيب للتفاعل لاذابة الجلسريدات المشبعة ويلاحظ أن إثيرات السيليل غير ثابته لفترة طويلة ولهذا يجب تحضيرها مباشرة قبل الاستعمال .

الفصل الخامس

البلورة الجزيئية

Fractional Crystallization

تعتبر طريقة البلورة الجزيئية باستخدام المذيبات من أقدم الطرق المستخدمة لفصل الدهون الطبيعية الى مكوناتها من الجلسريدات الثلاثية حيث تنوب الجلسريدات الغير مشبعة بدرجة أكبر فى مذيب كالأسيتون عن الجلسريدات المشبعة فالجلسريد الثلاثى PPO ينوب اكبر من PPP فى الاسيتون لذلك يمكن إستغلال تلك الظاهرة لفصل أنوا ع الجلسريدات الثلاثية عن بعضها حيث عن طريق تبريد محلول الاسيتون الذى يحتوى على كلا من PPO و PPP على ٢٠مْ نجد أن PPP " غير ذائب " يترسب على هذه الدرجة وبذلك يمكن فصل أنوا ع الجلسريدات الثلاثية بتكرار تلك العملية أكثر من مرة .

من ذلك يتضح أنه يمكن فصل الجلسريدات الثلاثية للدهون الطبيعية تبعا لعدد مجاميع الاسيل المشبعة أى على حسب عدد الاحماض الدهنية المشبعة الموجودة بجزىء الجلسريد الثلاثى أى تفصل الجلسريدات الثلاثية الى أربعة اقسام رئيسية وهى :

SSS و SSU و SUU و UUU

ولكن عمليا لا يمكن الحصول على الاقسام الاربعه السالفة الذكر لحدوث تداخل بين الجلسريدات وعند اعادة البلورة عدة مرات تنفصل الدهون الى مكونين وهما الصلبه والنصف صلبه والتى تكون فيها تركيب الجلسريدات الثلاثية مطابقا تقريبا للأحماض الدهنية الموجودة عليها وظلت تستخدم هذه الطريقة حتى سنة ١٩٦٠ ثم إستبدلت بطرق فصل أكثر دقة باستخدام طريق الفصل الكروماتوجرافى .

وفى عام ١٩٦٥ أدخل جنستون وآخرون Gunstone et al (1965) بعض التعديلات على هذه الطريقة حيث أستخدمت مذيبات تحتوى على أيون الفضة مما أدى إلى تحسين كفاءة الفصل وتعتمد طريقة الفصل هذه على عدد الروابط الزوجية لكل جزىء وليس كما سبق على حسب عدد الاحماض المشبعة وبصفة عامة لا تستخدم البلورة الجزيئية فى التقدير الكمى للجلسريدات على نطاق واسع ولكن تستخدم هذه الطريقة فى فصل الجلسريدات الثلاثية تبعا لمكوناتها من الاحماض الدهنية .

غير مشبع = U = Unsaturated حامض بالميتيك = P

مشبع = S = Saturated حامض أوليك = O

أولا : الطرق Methods

ا - المذيبات Solvents

يستخدم نوعان من المذيبات فى طرق البلورة الجزيئية لمخلوط الجلسريدات الثلاثية وهما :

أ - مذيبات تعتمد على عدد الاحماض الدهنية المشبعة أى على حسب عدد مجاميع الاسيل المشبعة بجزىء الجلسريد الثلاثى ومن أمثلتها الاسيتون والاثير .

ب - مذيبات تحتوى على أيون الفضة +Ag والتى تعتمد على عدد الروابط الزوجية التى توجد فى الجزىء أى على عدد الاحماض الدهنية الغير المشبعة .

* الطريقة التى تعتمد فى الفصل على عدد مجاميع الأسيل المشبعة فى الجلسريدات الثلاثية :

Nubmer of saturated acyl groups / TGS

أستخدم الأسيتون الجاف على نطاق واسع كمذيب فى البلوره الجزيئية لفصل مخلوط الجلسريدات الثلاثية والذى يعتمد فى فصله على عدد مجاميع الاسيل المشبعة حيث أن إختلاف عدد مجاميع الاسيل المشبعه الموجوده فى جزىء الجلسريدات الثلاثية TG يؤدى الى إختلاف فى درجة الذوبان فى الاسيتون والبلورات المتكونة يمكن التعرف عليها ويسهل ترشيحها .

عيوبها :

لهذه الطريقة مشكلة يجب تجنبها وهى إمتزاج الاسيتون بالماء المتكثف من الهواء الجوى على درجة الحرارة العادية وذلك لأن وجود كمية ولو قليلة من الماء فى الاسيتون تؤثر بدرجة ملحوظه على ذوبان الجلسريدات الثلاثية ويمكن تفادى هذه المشكلة بالاتى :

تجرى عملية البلوره فى وعاء مغلق وفى جو من النتروجين ويمكن إستخدام إثير البترول وكذلك الاثير بنجاح فى عملية فصل الجلسريدات الثلاثية بالبلوره نظرا لعدم إمتزاجهم بالماء ولكن تحتاج إلى كميات كبيرة من المذيب أما الايثانول والميثانول يستخدمان فى فصل TG

الاكثر قطبية ومن أمثلة ذلك الجلسريدات الثلاثية التى تحتوى أحماض دهنية قصيرة السلسلة وأيضا التى تحتوى على أحماض دهنية أكسوجينيه .

يوضع المحلول المراد بلورته فى قاع الانبوبه والتى على شكل V وتغمر فى حمام ذو درجة حرارة ثابتة .

ويمكن إسترجاع البلوره عن طريق إمالة الانبوبة (V) جهة اليمين مع إستخدام ضغط النتروجين من جهة (B) ويرشح المحلول خلال القرص المسامى الزجاجى (C) وبالنسبة للحمام ذو درجة الحرارة المعينة يجب أن يجهز بوسيلة ترشيح على نفس درجة الحرارة التى تمت عليها البلورة ويعطى المخلوط المبرد ثلج وملح إنخفاض فى درجة الحرارة حتى - ١٠مْ بينما يعطى الثلج الجاف فى الاسيتون درجة حرارة تتراوح من - ١٠ الى - ٧٨مْ . ومن الخطأ التحكم فى درجة الحرارة عن طريق الاضافة المباشرة بحبيبات الثلج الجاف الى المخلوط المبرد وذلك لانه يسبب تبريد مفاجىء وموضعى ويجب تقليب كل من محلول العينة والمحلول المبرد فى الحمام لتوزيع وتثبيت درجة الحرارة عند عملية البلوره وذلك حتى يتم تجانس درجة الحرارة خلالها ويكون تقليب محلول العينه برفق أو ببطىء حتى لا يحدث تكسير بللورات الجلسريدات الثلاثية ثم تترك ليحدث إتزان بين الجلسريدات الذائبة والمتبلوره وهذا الاتزان يتم ببطء شديد لذلك فان التبريد البطىء مرغوب ومطلوب للحصول على شكل جيد للبلورات وأفضل فصل ممكن . ويترك المحلول عادة على درجة الحرارة النهائية لمدة ٣ - ٢٤ ساعة قبل الترشيح وبعد إنتهاء عملية البلورة يسمح للجزء المتبلور بأن يرسب لاسفل ويرشح ويسحب المحلول الباقى . ويجب أن تتم عملية الترشيح على نفس درجة الحرارة التى تمت عليها عملية البلورة وبذلك نتجنب ذوبان أى بلورات فى المحلول أثناء الترشيح مرة أخرى ويتم ذلك بسهولة باستخدام الجهازين التاليين

ونظراً لاحتواء البلورات على كمية من المحلول المتبقى (الجلسريدات الذائبة) فانه يجب غسلها مرتين بواسطة نفس المذيب وفى نهاية كل عملية بلورة جزئية يجب معرفة كمية البلورات المنفصله وكمية الجلسريدات الذائبة بعد تبخير المذيب بالوزن .

* الطريقة التى تعتمد فى الفصل على عدد الروابط الزوجيه فى الجلسريدات الثلاثية :

Number of unsaturated double bonds / TGS

يمكن فصل الجلسريدات الثلاثية تبعا لعدد الروابط الزوجية الموجودة فى الوضع المضاهى CIS وذلك باجراء عملية البلورة باستخدام مذيبات تحتوى على نترات الفضة حيث يعمل أيون

الفضة Ag^+ على تكوين معقد مع الكترونات π للرابطة الزوجية وبالتالى تختلف درجة ذوبان الجلسريدات الثلاثية وهذا يؤدى إلى فصل الجلسريدات عن بعضها البعض بالبلورةعلى حسب عدد الروابط الزوجية .

وفى هذه الطريقة يستخدم مخلوط المذيبات الاتى : ميثانول مشبع بنترات الفضة / اسيتون بنسبة ٧٠/٣٠ مع الجلسريدات الثلاثية للدهون الطبيعية ويلاحظ أن كمية نترات الفضة الموجودة تساوى ضعف الكمية المطلوبة لعمل معقد مع الكترونات π لكل الروابط الزوجية الموجودة فى الجلسريدات الثلاثية .

وفيما يلى الشروط الواجب توافرها أثناء عملية البلورة :

١ - يجب أن يزود الحمام ذو درجة الحرارة الثابته الذى يوضع فيه خليط الجلسريدات بوسيلة لاجراء الترشيح عند نفس درجة حرارة البلورة - وعند إستخدام حمام الثلج الجاف فى الاسيتون فانه يعطى مدى درجات حرارة ما بين - ١٠ حتى - ٧٨°م .

٢ - يجب عند ضبط درجة حرارة الحمام الا يضاف قطع الثلج الجاف مباشرة الى مخلوط العينة حيث يؤدى هذا الى التبريد العالى فى مكان معين ويعطى فصل غير كاف .

٣- يجب أن يوضع مقلب فى الحمام عند إجراء بلورة عينات كبيرة لتقليب المخلوط على درجة حرارة موحدة Uniform temperature ويجب أن يكون تقليب محلول العينة بدرجة بسيطه حيث أن التحريك بمعدل عالى يؤدى الى كسر Fracture بلورات الجلسريدات الثلاثية.

٤ - نظرا لأن الاتزان ما بين الجلسريدات الغير ذائبة (البلورات) والذائبة يتم ببطء جدا كما أن التبريد البطيء مطلوب للحصول على تركيب بلورى جيد وأيضا للوصول الى الفصل العالى لا بد من ترك مخلوط الجلسريدات على درجة حرارة البلورة المطلوبه لمدة ٢٤ ساعة قبل إجراء عملية الترشيح .

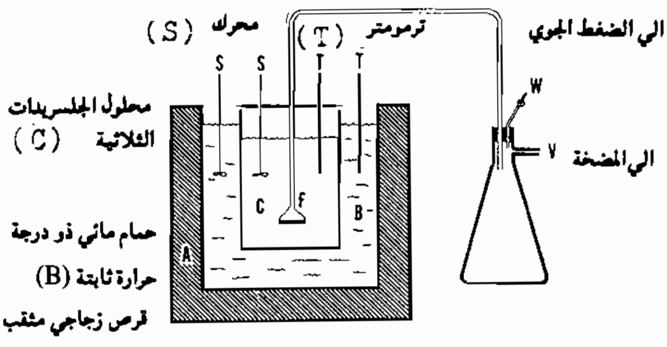
٥ - يجب بعد إنتهاء عملية البلوره ترك البلورات لترسب ثم يرشح المحلول المتبقى ويجب أيضا أن تجرى عملية الترشيح عند نفس درجة حرارة البلورة لمنع إعادة ذوبان البلورات . كما يجب أيضا عدم إحتواء البلورات على جزء من الراشح ولذلك تغسل البلورات مرتين بواسطة نفس المذيب الذى إستخدم فى عملية البلورة وله نفس درجة حرارة عملية البلورة .

٢ - طريقة العمل : Procedure

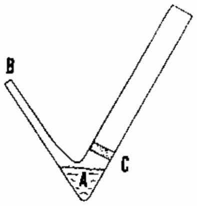
لفصل مخلوط الجلسريدات الثلاثية يجب إذابته فى مذيب مناسب ويمكن إستخدام الحرارة عند اللزوم ويتراوح نسبة المذيب الى العينة عادة ما بين ٥ : ١ الى ١٥ : ١ حجم / وزن وهى تعتمد على حسب طبيعة العينة واذا لم يتمكن توفير الحرارة الثابته الملائمة للبلورة يمكن إستخدام الجهازين الآتيين لعمل البلورة على نطاق كبير وكذلك على نطاق صغير :

١ - يوضع المحلول (A) المراد إجراء له عملية البلورة فى قاع الانبوبة التى على شكل حرف (V) وتغمر فى حمام مائى ذو درجة حرارة ثابتة .

٢ - تفصل البلورات عن طريق ميل Tilt الانبوبة (V) جهة اليمين ثم يمرر تيار من النتروجين من الفتحة (B) حيث يمر المترشح من خلال القرص الزجاجى المثقب (C) .



شكل (أ)



شكل (ب)

شكل (أ) فى العينات الكبيرة يستخدم قمع مقلوب مثقب كمرشح

Precooled filter stick with large bottles

شكل (ب) فى حالة العينات الصغيرة حيث يستخدم قرص مسامى زجاجى كمرشح

Fritted glass disk in the small - scale

ثانيا : التطبيقات Applications

أ - الفصل على أساس عدد مجاميع الاسيل المشبعة

Separation by number of saturated acyl groups

ا - خاصية الذوبان Solubility considerations

أ - عند إستخدام مذيبات مثل الاسيتون أو الاثير البترول فان عملية الفصل تعتمد على أساس عدد أو محتوى الاحماض الدهنية المشبعة والموجودة فى جزىء الجلسريدات الثلاثية .

ب - يمكن فصل مخلوط من الجلسريدات الثلاثية مثل StOO, StStL وذلك بطريقة البلورة التجزيئية باستخدام مذيبات مثل الاسيتون أو ايثير البترول.

حيث أن St StO وSt StLلهما نفس العدد من الاحماض الدهنيةالمشبعة.

: St StL و StOO لهما نفس عدد الروابط الزوجية .

فاذا كان عدم التشبع هو أساس الفصل فانه يمكن فصل StStO عن النوعين الاخرين واما اذا كان عدد الاحماض المشبعة هو اساس الفصل فانه يمكن فصل StOO فى النوعى الاخرين .

ونظريا فانه من الممكن فصل مخاليط الجلسريدات الثلاثية الى الاقسام الاربعة الرئيسية وهى SSS و SSU و SUU و UUU بواسطة البلورة الجزئية - وعمليا لا يمكن فصل هذه الاقسام عن بعضها البعض وتستخدم عملية البلورة فى الحصول على أى قسم مركز من الأقسام السابقة أى كل قسم يكون مختلطا بنسبة بسيطة من القسم الآخر القريب له فى درجة عدم التشبع ومن المعروف أن مخاليط الجلسريدات الثلاثية للبيدات الطبيعية لها تركيب معقد كما أن تأثيرات الذوبان المتبادل تؤدى إلى وجود جلسريدات ثلاثية فى المحلول وكان من المفروض أن تكون هذه الجلسريدات ضمن البلورات التى تنفصل عند درجة حرارة معينة . ومن المعروف أن الجلسريدات الثلاثية تكون بلورات حقيقية ببطء شديد وان ظروف الاتزان لا يمكن أن نصل إليها بسهولة تحت ظروف العمل العادية وعلى ذلك فان الفصل عن طرق البلورة الجزيئية تعطى جلسريدات مختلطة بالاضافة الى ذلك فان تأثيرات الذوبان المتبادل والجلسريدات المختلطة تزداد بزيادة عدم التشبع وعلى ذلك فهذه طريقة تستخدم فقط فى فصل

الدهون الصلبة فصلا حادا بينما يكون الفصل غير مناسب فى حالة الزيوت السائلة وهناك صعوبات أخرى تتمثل فى أنه عند وجود أحماض دهنية ذات طول سلسلة CI2 - C4 لها خصائص ذوبان تتشابه مع الاحماض طويلة السلسلة غير المشبعة - ونتيجة لكل هذه المشاكل فانه عن طريق الفصل بواسطة البلورة الجزيئية نحصل على فصل معقول فقط للدهون النصف صلبة وأن تحتوى على احماض دهنية بسيطة اى تحتوى الجلسريدات الثلاثية بصفة عامة على الاحماض الدهنية التالية 16:0 و 16:1 و 18:0 و 18:1 ونسبة لا تزيد عن ٣٠ ٪ من 18:2.

حامض لينوليك = L حامض إستياريك = S حامض أوليك = O

تتابع عمليات البلورة :

إن تتابع عملية البلورة المضبوط لفصل مخاليط الجلسريدات الثلاثية يعتمد بدرجة كبيرة على تركيب العينة وأنه يمكن فصل الجلسريدات الثلاثية لعينة ما بالرجوع الى الطرق المذكورة فى المراجع لفصل عينه من دهن أخر قريب لها فى التركيب . والرسم التخطيطى التالى (صفحة ١٢٦) يبين تتابع عملية البلورة لفصل الجلسريدات الثلاثية لدهن الغنم الى مكونات تختلف بدرجة كبيرة عن بعضها البعض فى محتواها من الجلسريدات المختلفة .

تجرى عمليات البلورة للعينات باستخدام مخاليط ١٠٪ فى الاسيتون أو فى الاثير على درجات الحرارة المبينة بالشكل التخطيطى ، والجدول فى صفحة ١٢٤ يبين التركيب الكيماوى للاحماض الدهنية لستة المكونات الناتجة من عملية البلورة .

تأثيرات الذوبان المتبادل Mutual Solubility Effects

يؤدى الذوبان المتبادل خاصة فى وجود جلسريدات مختلطة إلى وجود نسبة من نوع معين من الجلسريدات الثلاثية فى صورة ذائبة أى غير مترسبة (أى لا تكون ضمن البلورات) وحيث من المفروض طبقا للأساسيات التى سبق ذكرها أن تكون ضمن البلورات عند درجة حرارة معينة.

أى يفهم مما سبق أن بعض الجلسريدات حينما تكون فى المذيب على حدة أى ليست فى مخلوط وعند التبريد فيتوقع أن تكون كمية البلورات كبيرة أى لا تنوب فى المذيب بل تترسب . بينما نفس هذه المركبات إذا وجدت فى مخلوط من TGS وعلى نفس درجة الحرارة فانه يتبقى جزء منها فى المذيب فى صورة ذائبة أى تقل كمية البلورات نتيجة لوجود جلسريدات أخرى قريبه لها فى التركيب الكيماوى " مثل SSS و SSU وكذلك UUU و UUS .

وعملية تكوين بلورات من TGS تمثل نوعية معينه تعتبر عملية بطيئة جدا لأن الاتزان لا يمكن الوصول اليه بسهولة تحت الظروف المعملية العادية .

كما تحدث خاصة النوبان المعاكس " أى تؤدى الى ذوبان انواع معينه من الجلسريدات من المفروض أنها تكون ضمن الجلسريدات المتبلوره وتظهر هذه الخاصية بدرجة واضحة فى وجود الجلسريدات المختلفة أى أنه يوجد تأثير متبادل على درجة النوبان كما يزداد هذا التأثير بزيادة درجة عدم التشبع لذلك من السهل فصل الدهون الصلبه لأن نسبة الأحماض الغير مشبعة قليلة وبالتالى يقل تأثير العوامل التى تعوق تكوين البلورات التى تخص تركيب معين ويزيد من صعوبة فصل جلسريدات الزيوت السائلة الى وجود الاحماض التى تحتوى على C4 - C12 والتى لها نفس درجة النوبان للأحماض الدهنيه ذات السلسلة الكربونية الطويلة والغير مشبعة .

مما سبق يتضح أن أفضل عملية فصل بالبلورة يمكن الحصول عليها فى حالة الدهون النصف صلبة والتى تحتوى على الاحماض الدهنية البسيطة مثال ذلك مخلوط TGS الذى يحتوى على أحماض بالميتيك – بالميتوأوليك – إستياريك – أوليك وأقل من ٣٠٪ لينوليك .

البلورة المتتابعة Crystallization Sequence

تختلف عملية تتابع البلورة لفصل المخاليط من الجلسريدات الثلاثية اختلافا كبيرا على حسب تركيب العينة ولاجراء عملية البلورة الجزيئية لدهن ما فانه يمكن الاستعانه بالطرق المذكوره فى المراجع والتى تستخدم دهون قريبة فى التركيب مع العينه المختبرة .

والشكل التالى يوضح نتائج عملية البلورة لفصل الجلسريدات الثلاثية من دهن الغنم الى مكوناتها المختلفة آخذا فى الاعتبار إختلاف تركيب TGS بقدر الامكان .

العينات التى يجرى عليها البللورة عبارة عن ١٠٪ (وزن حجم) فى محلول الاسيتون (A) أو اثير (E) على درجة الحرارة المشار اليها ، والاحماض الدهنية المكونة للاقسام الستة النهائية موضحة بالجدول (١٦) :

جدول(١٦)

المكونات	Fraction (mole%)			الاقسام (مول ٪)			
	I	II	III	IV	V	VI	Total
Component acids تركيب الاحماض							
Saturated (S) مشبعة	94.8	75.6	63.1	49.8	36.0	18.2	60.8
Unsaturated (U) غير مشبعة	5.2	24.4	36.9	50.2	64.0	81.0	39.2
Component TG تركيب الجلسريدات الثلاثية							
SSS	84.4	35.2	23.2	13.0	*	*	28.0
SSU	15.6	56.4	42.3	23.4	8.1	*	28.5
SUU	*	8.4	34.5	36.9	91.8	54.6	40.7
UUU	*	*	*	*	*	45.4	2.8

تم حساب تركيب الجلسريدات الثلاثية من :

١ – تركيب الاحماض الدهنية كاقسام منفردة

٢ – محتوى الاحماض الدهنية المشبعة SSS مقدرة عن طريق الاكسدة بالبرمنجات البوتاسويم KM_mO_4 .

٣ – المكونات المشار اليها * تكون غير موجودة بالاقسام التى بها العلامة .

ب – الفصل على أساس عدد الروابط الزوجية

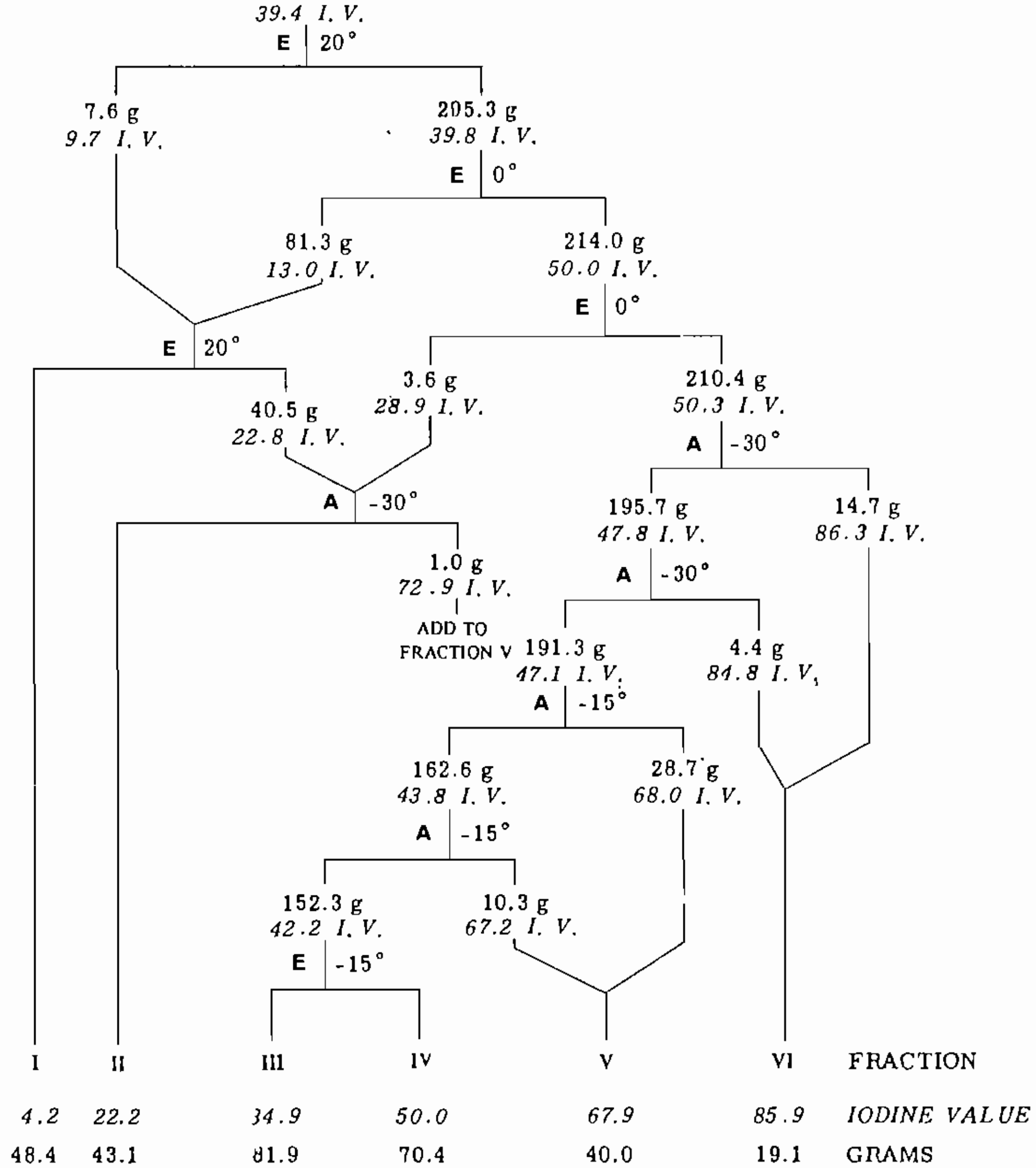
Separation by number of double bonds

فى المحاولات الاولى التى أجراها هيلدتش وسيڤيل (Hilditch and Seavell, 1950) لفصل الجلسريدات العالية فى عدم التشبع من الدهون الطبيعية وذلك باجراء عملية البلورة باستخدام الاسيتون فقط على درجة حرارة من – ١٠ْم الى – ٧٠ْم كانت غير ناجحة .

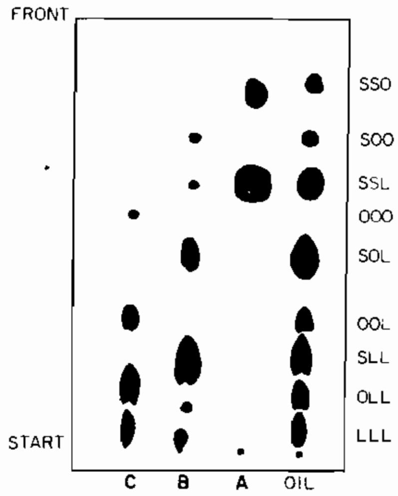
إلا أنه يمكن فصل خليط الجلسريدات الثلاثية بكفاءة تبعا لمحتواها من الروابط الزوجية فى الوضع CIS وذلك باجراء عملية البللورة باستخدام مذيبات تحتوى على نترات فضه A_gNO_3

بتكوين المعقد بين Ag^+ والكترونات π للرابطة الزوجية مع تغيير درجة حرارة البللورة للجلسريدات وبذلك يتم الفصل على حسب درجة عدم التشبع وقد استخدمت هذه الطريقة لفصل TGs من دهون بعض النباتات مثل Jatropha Cursas وذلك باستخدام مذيبات مشبعة بمحلول نترات الفضة والمذيبات المستخدمة هى ميثانول / أسيتون بنسبة ٧٠/٣٠ وعلى درجة حرارة – ١٠ْم والرسم التخطيطى التالى يبين أن (A) هو راسب يحتوى أساسا على SSU أى يحتوى على رابطة واحدة أو رابطتين زوجيتين فى جزىء TG وعند تبريد الراشح على – ٧٠ْم أعطت بللورات (B) تتبع القسم SUU والذى يحتوى على ٣ أو ٤ روابط زوجية أما المتبقى (Mother liquor) (٢) كله تقريبا UUU يحتوى على ٥ أو ٦ روابط زوجية لكل جزىء TG.

ومن الملاحظ عند إجراء عملية البلورة مرتين فى وجود Ag^+ فانها تعمل على تفريد جيد لمكونات TG لدهن نبات Jatropha Cursas كما فى شكل حـ ، s وهذا الفصل أفضل بكثير من إجراء عملية البللورة عشر مرات باستخدام مذيبات تخلو من Ag^+ لتفريد TG لدهن الغنم كما فى شكل هـ ، وهذه الطريقة لها أهمية كبيرة اذا كان المطلوب بصفة خاصة فصل كل من SUU و UUU عن بعضهما البعض .

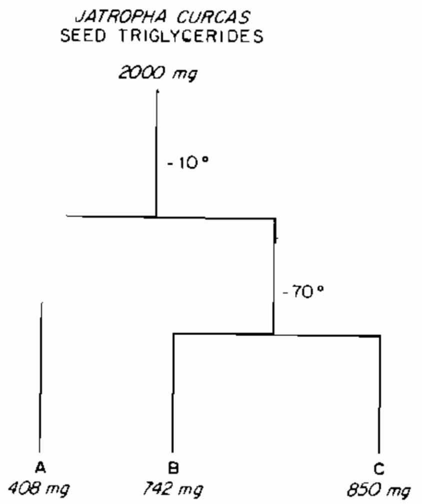


شكل تخطيطى يبين فصل الجلسريدات الثلاثية لدهن الغنم .



الشكل الأيمن :

يبين فصل المكونات الثلاثة السابقة من الشكل السابق (A,B,C) وتم إجراء تحليل عليها باستخدام الواح TLC المدعمة +Ag " تحضر المادة الدعامية من حامض السيليسيك مع ١٧٪ نترات فضة "وباستخدام المذيب بنزين / اثير (١٠/٩٠ حجم/حجم) .



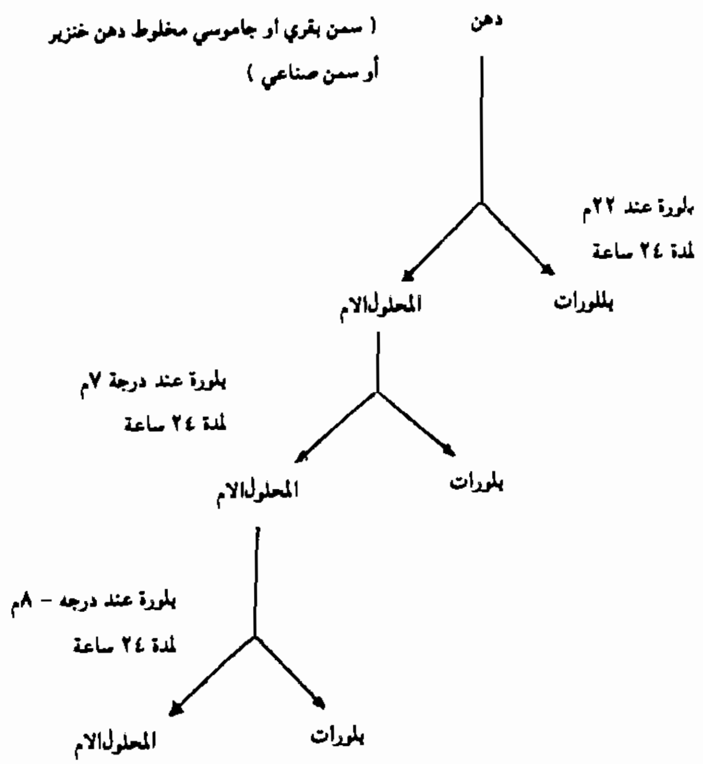
الشكل الايسر : .

يعتمد الفصل على أساس عدد الروابط الزوجية فى الوضع CIS وباجراء عملية البلوره المتتابعه وفى وجود أيون الفضه .

أخذت وزنه معلومه من العينة (٢٠٠ ملجم) وبلورتها على - ١٠ْم ولمدة ٢٤ ساعة فى وجود ١٠ سم٣ ميثانول ومشبع بمحلول نترات الفضة $A_g NO_3$

أسيتون ٣٠/٧٠ ثم الترشيح ثم تكرار البلوره للمحلول على - ٧٠ْم ولمدة ٢٤ ساعة باستخدام مذيب اثير البترول

ومن تطبيقات البلورة الجزيئية عند درجات منخفضة هى الكشف عن خلط السمن البلدى بدهن الخنزير حيث أجريت عدة عمليات بلورة لسمن بقرى وسمن جاموس نقى مخلوط بدهن خنزير وسمن صناعى بنسب من ٥ - ٣٠٪ باستخدام مذيبات محتوية على أيون الفضة - ثم إذابة العينات المراد تقديرها فى خليط من الميثانول المشبع بنترات الفضة وأسيتون بنسبة ٣٠/٧٠ (حجم / حجم) ونسبة الليبيدات إلى نترات الفضة فى المخلوط هى ١ : ١٠ (وزن / حجم) أجريت عملية البلورة الاولى عند درجة حرارة الغرفة وفصلت البلورات عند نفس درجة الحرارة بعد ٢٤ ساعة ثم أجريت عملية بلورة ثانيه للمحلول الام عند درجة حرارة ٧ْم - وتم فصل البلورات من المحلول الأم بعد عملية الاتزان وأجريت عملية بلورة ثالثة للمحلول الأم الناتج من البلورة الثانية على درجة - ٨ْم وتم معرفة نسبة الاحماض الدهنية فى كل جزء متبلور والشكل التخطيطى التالى يبين خطوات عمليات البلورة المتتابعة (Farag et al., 1983) .



تبين الجداول ١٧ و ١٨ تركيب الاحماض الدهنية للبلورات المفصولة على درجات حرارة ٢٢ ، ٧ ، – ٨ْم والتى توضح إختلاف التركيب الكيماوى للمخاليط عن التركيب الاصلى للسمن الطبيعى البقرى أو الجاموس .

ومن ثم يمكن معرفة مدى غش الدهون الطبيعية بدهون الخنزير والسمن الصناعى .

وأستخدام أيضا رقم بومر Boemer Number لمعرفة مقدار خلط الدهون الحيوانية النقيه بدهون حيوانية أخرى عن طريق عملية البلورة كما يلى :

جدول(١٧)

التغير في النسب المئوية للأحماض الدهنية الشائعة في السمن البقري ، الخنزير ، السمن الصناعي والعينات المخلوطه الناتجه من عملية البلورة الجزئية .

نسبة الخلط		١٤:صفر	١٦:صفر	١٨:صفر	١:١٨	٢٠:صفر	٢٢:صفر	١٤:صفر	١٦:صفر	١٨:صفر	١:١٨	٢٠:صفر	٢٢:صفر	١٤:صفر	١٦:صفر	١٨:صفر	١:١٨	٢٠:صفر	٢٢:صفر
بقري	خنزير	المكون الاول						المكون الثاني						المكون الثالث					
١٠٠	صفر	٧.٧	٢٤.٧	٧.–	٦.٩	١٠.٨	٤٠.–	٤.٨	١٦.٩	٢.٧	٥.٤	١١.٣	٥٦.٥	٦.–	١٦.–	٢.٣	٥.–	١٢.١	٥٦.٥
٩٥	٥	١١.٣	٢٩.٤	٧.٥	١٧.٥	٧.٨	٢٣.٤	٢.٦	١٦.٣	٢.٦	١.٢	١٣.٣	٦١.–	٥.–	١٦.٣	٢.٢	٦.٢	١٢.–	٥٦.–
٩٠	١٠	١١.٣	٢٩.٦	٩.٢	١٩.٤	٤.٨	٢٢.٦	٢.٥	١٤.٨	٣.١	١.٣	١٣.٢	٦٢.–	٤.٧	١٥.٩	٢.٥	٥.٢	١٢.٣	٥٦.٦
٨٥	١٥	١٠.٨	٢٩.٥	٩.٨	٢٠.٧	٤.٥	٢١.١	٢.١	١٤.١	٢.٥	١.٣	١٣.٢	٦٥.–	٢.٢	١٠.٤	٢.١	٢.٤	١٢.٦	٦٧.٨
٨٠	٢٠	٩.١	٣٥.–	٩.٢	٢٤.٣	٤.٤	١٥.١	٢.٢	١٣.٨	٢.٤	١.٤	١٢.٥	٦٥.٤	٢.٨	٨.٨	٢.٦	١.٨	١٢.٦	٦٨.٦
٧٥	٢٥	٨.٧	٣٦.٤	١٠.٢	٢٤.٧	٣.٢	١٥.٣	٢.٢	١٢.٩	١.٨	١.٤	١١.٥	٦٧.٨	٢.١	٧.٦	٢.–	١.–	١٢.–	٧٣.–
٧٠	٣٠	٨.٦	٣٦.٧	٩.٦	٢٣.٥	٢.٨	١٧.١	٢.١	١٢.٨	١.٨	١.٤	١١.٣	٦٩.٢	٢.–	٦.٦	١.٣	١.–	١٢.٤	٧٤.–
صفر	١٠٠	٢.٢	٣٦.٢	١٢.٨	٢٢.٣	٨.–	١٨.٣	٠.١	٢.٢	١.١	١.٦	٦.٧	٨٨.١	٠.٢	١.٧	٠.٥	٠.٩	٦.٢	٩٠.–
بقري	سمن صناعي																		
١٠٠	صفر	٧.٧	٢٤.٧	٧.–	٦.٩	١٠.٨	٤٠.–	٤.٨	١٦.٩	٢.٧	٥.٤	١١.٣	٥٦.٥	٦.–	١٦.–	٢.٣	٥.–	١٢.١	٥٦.٥
٩٥	٥	٨.٥	٢٣.٩	٦.١	٨.٣	١٠.٥	٤٠.–	٣.٧	١٦.٧	٢.٩	٣.١	١١.٥	٥٩.٧	٤.٩	١٥.٤	٢.٩	٤.٤	١٢.١	٥٨.–
٩٠	١٠	٨.٢	٢٢.٧	٦.٢	١٥.٣	٦.٩	٣٧.٨	٤.٦	١٥.٣	٢.٣	٣.٢	١٨.٧	٥٩.٢	٣.٩	١٣.٧	٢.٩	٤.٤	١٠.٩	٦٠.٩
٨٥	١٥	٨.–	٢٧.٢	٥.٤	٢٤.٥	٤.٩	٢٧.٧	٢.٢	١٤.٩	٢.٢	١.٢	١٣.٧	٦٤.–	٣.٩	١٠.٦	٢.–	٤.–	٩.–	٦٧.٤
٨٠	٢٠	٨.٢	٢٧.٣	٥.٧	٢٥.–	٤.٩	٢٦.٣	٢.–	١٥.–	٣.–	١.٢	١٣.٩	٦٢.٧	٣.٤	١٠.٥	٢.٨	٤.٤	٨.٦	٦٦.٢
٧٥	٢٥	٧.–	٢٧.١	٥.–	٢٩.–	٥.–	٢٤.٢	١.٧	١٢.٧	٣.٢	١.٢	١٢.٢	٦٤.–	٢.٦	١٠.٤	٢.٦	٤.٣	٧.٨	٦٩.٢
٧٠	٣٠	٦.٢	٢٨.٢	٤.٢	٣٧.٥	٤.٢	١٧.٧	١.٨	١٢.٦	٣.–	١.١	١٢.–	٦٧.١	٢.٦	٨.٧	٢.٢	٤.٢	٧.٨	٧١.٤
صفر	١٠٠	١.–	٢٨.٥	١.–	٥٥.١	١.–	١٣.٢	٠.٣	٣.٦	٠.١	٨.٤	١.٧	٨٥.٧	٠.٢	٢.٨	٠.١	٦.٨	٤.٣	٨٥.٦

١٤ : صفر = حامض ميرستيك ١٦ : صفر = حامض بالميتيك ١٨ : صفر = حامض استياريك ١٨ : ١ = حامض اوليك ٢٠ : صفر = حامض اراشيديك ٢٢ : صفر = حامض بهنك

جدول(١٨)

التغير في النسب المئوية للأحماض الدهنية الشائعة في السمن الجاموسي ، الخنزير ، السمن الصناعي والعينات المخلوطه الناتجه من عملية البلورة الجزئية

نسبة الخلط		١٤ صفر	١٦:صفر	١٨:صفر	١:١٨	٢٠:صفر	٢٢:صفر	١٤:صفر	١٦:صفر	١٨:صفر	١:١٨	٢٠:صفر	٢٢:صفر	١٤:صفر	١٦:صفر	١٨:صفر	١:١٨	٢٠ صفر	٢٢:صفر
جاموس	خنزير			المكون الاول						المكون الثاني						المكون الثالث			
١٠٠	صفر	١٠.٧	٣٠.١	٦.٩	١٨.٧	٨.٥	٢٢.٢	٢.٧	١٢.١	١.٩	١.٥	١٢.٤	٦٧.١	٢.١	٥.٨	١.٧	١ر٤	١٧.٥	٦٨.٤
٩٥	٥	١٠.٧	٣٢.٥	٧.٤	١٩.٣	٧.٣	٢٠ر-	١.١	١٢.٥	٢.٨	١.٣	١١.٦	٦٧.٢	٢.-	٤.٩	٢.٢	١ر-	١٧ر-	٦٩.٢
٩٠	١٠	٨.٧	٣٢.٥	٩ر-	٢٢.٣	٥.١	١٩.٩	١.٨	١٢.٨	٢.٨	١.٣	١٢.٦	٦٥.٥	١.٩	٤.٧	١.٥	٠.٠	١٧ر-	٧٠.١
٨٥	١٥	٨ر-	٣٢.٥	٩.١	٢٢.٩	٥.١	٢٠ر-	١.٧	١٢ر-	٢.١	١.٣	١٣.-	٦٨.-	١ر-	٣.١	١.٩	٠.٧	١٧ر٣	٧٤ر-
٨٠	٢٠	٧.٧	٣٣.٥	٩.١	٢٣.٥	٥.٤	١٨.١	١.٧	١٢.٤	٢ر-	١.٣	١٢.٤	٦٧.٦	١.٢	٣.٢	٢ر-	٠.٥	١٧ر٠	٧٢ر-
٧٥	٢٥	٧.١	٣٣.٣	٩.٦	٢٥.١	٤.٩	١٧.٨	٠.٩	١٢.١	١.٩	١.٤	١١.١	٧٠.٨	١ر-	٣ر-	١.٣	١ر-	١٥.٣	٧٥ر٤
٧٠	٣٠	٥.٩	٣٤.٢	٨.٩	٢٧.٥	٤.٤	١٧.٣	٨ر-	١٢.٣	١.٤	١.٣	١٠.٣	٧٢.١	١.٣	٢.٤	١.٥	١.١	١٣.٩	٧٧ر٢
صفر	١٠٠	٢.٢	٣٦.٢	١٢.٨	٢٦.٣	٤ر-	١٨.٣	١ر-	٢.٢	١.١	١.٦	٦.٧	٨٨.١	٢ر-	١.٧	٥ر-	٩ر-	٦.٢	٩٠ر-
جاموس	سمن صناعي																		
١٠٠	صفر	١٠.٧	٣٠.١	٦.٩	١٨.٧	٨.٥	٢٢.٢	٢.٧	١٢.١	١.٩	١.٢	١٢.٧	٦٧.١	٢.١	٥.٨	١.٧	١.٤	١٧.٥	٦٨ر٤
٩٥	٥	١١.٢	٣١.٩	٥.٩	٢١.٧	٧.٧	١٨.٤	١.٨	١١.٥	٢ر-	١.١	١٤.٦	٦٦.١	١.٩	٦ر-	١.٩	١.٥	١٦.٤	٧١.٣
٩٠	١٠	٧.٨	٣٢.٥	٥.٦	٢٤.٤	٧ر-	١٩.٩	١.٧	١٢ر-	٢.٤	١.١	١٢.٢	٦٧.٦	١.٥	٧.٤	١.٣	١.٥	١٦ر-	٧١.٢
٨٥	١٥	٩ر-	٣١.٢	٥.١	٢٦.٥	٥.٣	٢٠.٣	١ر-	١٢.١	٢.٥	١.٣	١١.٥	٦٩ر-	٢.٤	٤.٨	٢.١	١.٦	١٢ر-	٧٣.١
٨٠	٢٠	٧.٣	٣٠.٨	٤.٦	٣٤.٨	٤.٨	١٤.٩	١.٥	١٢.٢	٢.٢	١.١	١٢.٢	٦٨.٥	١.٦	٥.٩	١.٩	١.٦	١١ر١	٧٤.٤
٧٥	٢٥	٨.٣	٣٠.٥	٣.٢	٣٥.٩	٣.٧	١٦.٢	١.٤	١٢.١	٢.٥	١.٥	١٠.٥	٦٩.٣	١.٢	٤.٨	١.٨	١.٧	١٠ر٢	٧٦.٨
٧٠	٣٠	٧.٩	٣١.١	٣.٣	٣٥.٨	٣.٨	١٦.٥	١.٢	١٢.١	٢.٥	٢.٦	١٠.٨	٦٩ر-	١.٤	٥.٤	٢ر-	١.٨	٩ر٩	٧٧ر-
صفر	١٠٠	١ر-	٢٨.٥	١ر-	٥٥.١	١ر-	١٣.٢	٣ر-	٣.٦	١ر-	٨.٤	١.٧	٨٥.٧	٥ر-	٢.٨	١ر-	٦.٨	٤ر٣	٨٥.٦

١٤ : صفر = حامض ميرستيك ١٦ : صفر = حامض بالميتيك ١٨ : صفر = حامض استياريك ١٨ : ١ = حامض اوليك ٢٠ : صفر = حامض اراشيديك ٢٢ : صفر = حامض بهنك

تؤخذ كمية من الدهون الحيوانية النقية والمخلوطة وتصهر وترشح ثم يذاب الدهن المصهور فى أسيتون ويترك على درجة ٣٠ م لمدة ١٨ ساعة – تفصل البلورات بالترشيح عن المحلول الام ثم تغسل البلورات بواسطة الاسيتون . وتترك البلورات لتجف هوائيا ثم تستكمل عملية التجفيف فوق كبريتات الماغنسيوم ثم يعين لها درجة الانصهار .

يؤخذ جزء من بلورات الجلسريدات الثلاثية (٥٠٠ جم) وتجرى لها عملية تصبن بواسطة بوتاسا كاوية كحولية (٠.٥ ع) ثم تفصل الاحماض الدهنية من املاحها بواسطة حامض معدنى وتستخلص الاحماض الدهنية المنفردة بواسطة اثير – يبخر الاثير للحصول على الاحماض الدهنية ثم يقدر لها درجة الانصهار .

وقبل تقدير درجة الانصهار للجلسريدات الثلاثية والاحماض يجب وضعها فى ثلاجة على درجة ٤ْم ومن المعادلة التالية تستنتج مدى خلط الدهون النقية بدهون اخرى .

رقم بومر = أ + ٢ (أ – ب)

حيث :

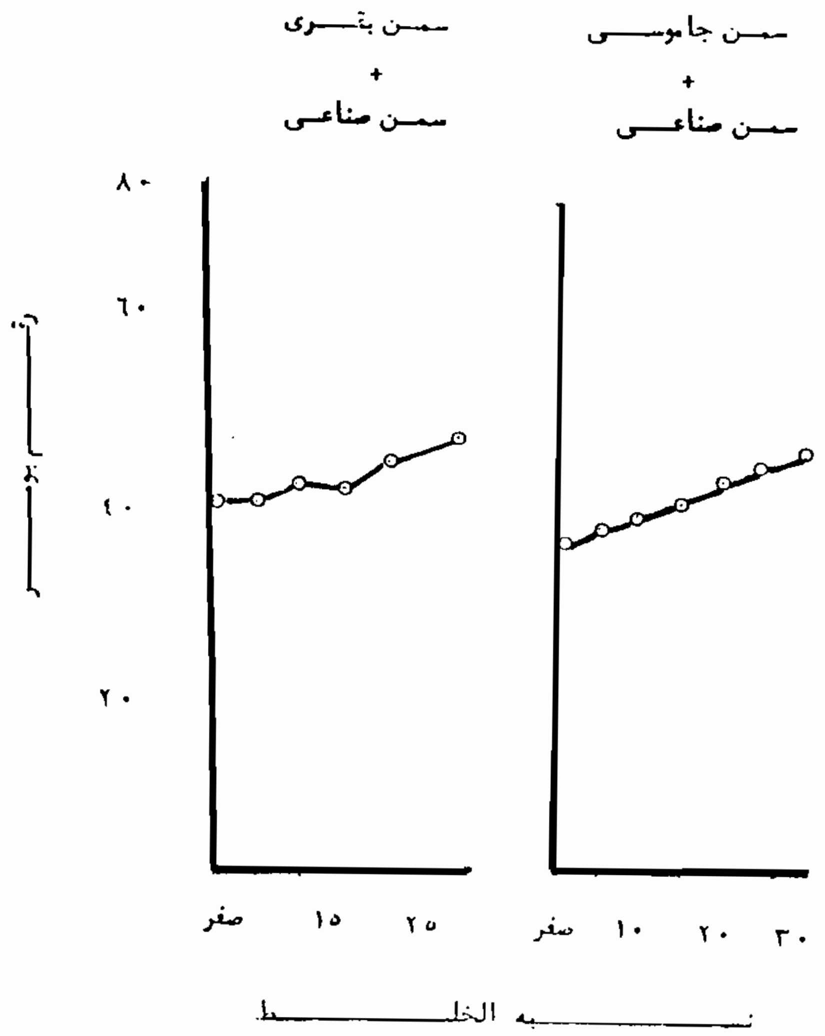
أ = درجةانصهار الجلسريدات الثلاثية .

ب = درجة انصهار الاحماض الدهنية .

والجدول (١٩) يبين أرقام بومر لخلط السمن الجاموسى بدهون الخنزير والسمن الصناعى

جدول(١٩)

السمن الجاموسى	دهن الخنزير	رقم بومر	السمن الصناعى	السمن الجاموسى	رقم بومر
١٠٠	صفر	٤٠	صفر	١٠٠	٤٠
٩٥	٥	٤٤	٥	٩٥	٤٢
٩٠	١٠	٥٠	١٠	٩٠	٤٤
٨٥	١٥	٥٨	١٥	٨٥	٤٥
٨٠	٢٠	٦٤	٢٠	٨٠	٤٨
٧٥	٢٥	٦٨	٢٥	٧٥	٥٠
صفر	١٠٠	٧٦	١٠٠	صفر	٦٠



تأثير خلط السمن البقرى والجاموسى بدهن الخنزير والسمن الصناعى على رقم بومر

:تشير النتائج السابقة الى أن خلط أو غش السمن الجاموسى بدهون الخنزير او السمن الصناعى ادى الى زيادة تدريجية فى رقم بومر – والشكل فى صفحة ١٣٨ يبين العلاقة ما بين رقم بومر وخلط الدهن الجاموسى والبقرى مع دهن الخنزير أو السمن الصناعى .

ومن تطبيقات عملية البلورة البسيطة المستخدمة منذ فترة طويلة هى : الكشف عن دهن الخنزير فى الزيوت المهدرجة والدهون الاخرى طبقا للطرق التالية :

الفحص الميكروسكوبى للبلورات :

وهى تعتمد على تركيز معظم بلورات جليسريدات بالميتوثنائى إستيارين وفصلها (وهى توجد فى دهن الخنزير بنسبة صغيرة) عند درجة حرارة تتراوح بين ٢٥ ، ٣٠°م تحت ظروف معينه .

الجواهر الكشافة :

كحول مطلق – إثير – مذيب (١ حجم إثير + ٢ حجم كحول مطلق)

الاجهزة والادوات :

جهاز طرد مركزى – أنابيب جهاز الطرد المركزى سعة حوالى ١٠ سم٣ – ميكروسكوب .

طريقة العمل :

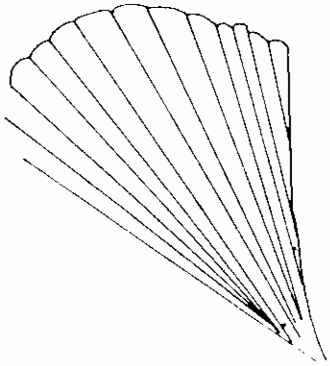
يسخن حوالى ٥ جم من العينه تسخينا هينا عند ٥٠°م حتى ينصهر الدهن تنقل ٥٠ قطرة من الدهن المنصهر إلى إحدى الانابيب ويضاف إليها ٩ سم٣ من المذيب ثم تمزج المحتويات جيدا . توضع الانبوبة فى حمام مائى بارد وتقلب محتوياتها بواسطة ساق الترمومتر حتى اذا ما اصبحت درجة حرارتها ٢٤ ± ١°م إنفصلت المجموعة الأولى من الجليسريدات ذات الوزن الجزئى العالى . يرفع الترمومتر وتوضع الانبوبه فى جهاز الطرد المركزى ويدار الجهاز لمدة دقيقتين ليتجمع الراسب فى قاع الانبوبة فى جهاز الطرد المركزى ويدار الجهاز لمدة دقيقتين ليتجمع الراسب فى قاع الانبوبة .

تستبعد الطبقة السائلة وتقاس درجة حرارة الغرفة ثم يضاف الاثير إلى الراسب المتجمع فى الانبوبة قطرة قطرة مع التقليب المستمر بلطف بواسطة الترمومتر حتى يكاد يذوب معظم الراسب ويصبح المحلول الاثيرى عكرا غير رائق . توضع الانبوبة فى حمام مائى درجة حرارته لا تزيد على درجة حرارة الغرفة باكثر من ثلاث درجات مئوية ثم يرفع الترمومتر بعد أن يصبح المحلول رائقا تسد الانبوبة بقطعة من القطن وتترك فى حمام مائى (عند درجة حرارة لا تزيد

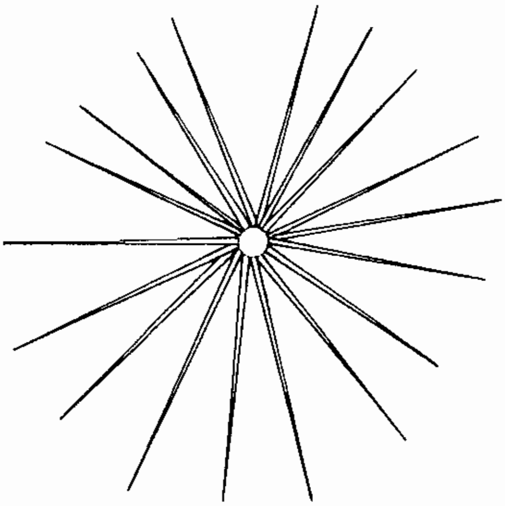
على درجة حرارة الغرفة باكثر من ٣مْ) وتترك جانبا لمدة تتروح بين ٣ - ٤ ساعات إلى أن تتكون بلورات كبيرة من الجلسريدات .

تنقل بعض البلورات إلى شريحة ميكروسكوب زجاجى بها قطرة من زيت متعادل مثل زيت الزيتون ثم تغطى بغطاء الشريحة الزجاجية مع مراعاة عدم الضغط حتى لا يتغير شكل البلورات ثم تفحص بالميكروسكوب .

نظرا لان دهن الخنزير يحتوى على نسبة صغيرة من الجليسريدات ألفا بالميتوثنائى إستيارين فان ظهور البلورات المميزة لهذا النوع من الجلسريدات (شكل و) وهى عريضة الاطراف ذات مقطع مائل ليست متفرعه من مركز واحد إلى جانب بلورات الجلسريدات الاخرى وهى إبرية الشكل مدببه (شكل ز) يدل على وجود دهن خنزير بالعينه واذا لم تظهر البللورات المميزة للجلسريدات الفا بالميتوثنائى إستيارين فان العينه تكون خالية من دهن الخنزير .



شكل رقم ٣
بلورات ألفا بالميتوثنائى سنيارين



شكل رقم ٤
بلورات الجلسريدات الأخـرى

الاختبار الكيميائى للبلورات :

تعتمد هذه الطريقة على فصل جليسريدات الدهن أو الزيت المهدرج أو الخليط عن طريق بلورتها جزئيا من الاسيتون ثم تقدير الشوائب المختلفة للاجزاء المنفصلة .

الجواهر الكشافة :

أسيتون – يود – حمض خليك ٩٩.٥٪ – بروم – ثيوكبريتات الصوديوم – يوديد البوتاسيوم – هيدروكسيد صوديوم – جليسرين – كبريتات فضه – هيدروكسيد باريوم – دليل فينولفتالين (محلول ١ ٪) .

الاجهزة والادوات :

دورق مخروطى سعة ٢٥٠ سم٣ – حمام مائى – قمع بوخنر – مجفف زجاجى به كلوريد كالسيوم .

طريقة العمل :

يوزن حوالى ٥٠ جم من العينه فى دورق مخروطى جاف نظيف سعة ٢٥٠ سم^{٣} يضاف اليها الاسيتون تدريجيا – حوالى ١٠٠ سم^{٣} – ويغلى المزيج فوق حمام مائى أو سخان كهربائى حتى تمام ذوبان الدهن – تزاد كمية الاسيتون اذا لزم الامر .

يرشح المحلول وهو ساخن من خلال ورقة ترشيح مثناه ويركز السائل الراشح بتسخينه فوق حمام مائى حتى يبدأ الراشح فى التعكر . ثم يترك ليبرد عند درجة حرارة الغرفة (لا تزيد على ٢٠ مْ) حتى تنفصل البلورات . يتم الحصول على البلورات بالترشيح فى قمع بوخنر تحت تفريغ ثم تغسل البلورات بقليل من الاسيتون البارد وتوضع فى المجفف الزجاجى ويفرغ المجفف (من الهواء) ويحتفظ بهذا الجزء " البلورات الموجودة فوق ورق الترشيح " ويطلق عليه الجزء " أ " .

يقطر الاسيتون تماما من السائل الراشح (وبعد فصل البلورات) فوق حمام مائى ويحتفظ بالسائل الزيتى المتبقى ويطلق عليه الجزء "ب" .

تقدر الثوائب التالية فى كل جزء وهى : الرقم اليودى – رقم رايخرت – رقم بولنسكى – رقم كرشنر – ثم تقارن الثوابت المقدرة لتمييز انواع الدهن تبعا للجدولين ٢٠ و ٢١ :

جدول (٢٠)

الثوابت	زيت نباتي مهدرج	دهن حيواني (غير الخنزير)	دهن الخنزير
الرقم اليودى	٥١ – ٥٣	٢٥ – ٣٠	٢٧ – ٣٠
رقم ريخرت	٢.٥ – ٢.٧	٢.٥ – ٣.٥	٩ – ١٠
رقم بولنسكى	٠.٧ – ٠.٨	٠.٨ – ١.٢	٠.٧ – ٠.٨
رقم كرشنر	١.٨ – ٢	١.٥ – ١.٨	٦ – ٧

جدول (٢١)
ثوابت الجزء (ب) المتبقى بعد تقطير الاسيتون

الثوابت	زيت نباتي مهدرج	دهن حيواني (غير الخنزير)	دهن الخنزير
الرقم اليودى	٧٥ – ٨٠	٤٥ – ٦٠	٦٢ – ٦٨
رقم ريخرت	٣.٥ – ٤.٥	٣ – ٣.٥	٧ – ٧.٥
رقم بولنسكى	٠.٥ – ٠.٩	٠.٨ – ١.٤	٠.٥ – ٠.٦
رقم كرشنر	٢.٢ – ٢.٥	٣ – ٤.٥	٦.٥ – ٧.٢

ملاحظـات :

أ – الزيوت النباتية المهدرجه تمتاز بما يلى :

فى الجزء (أ) يكون الرقم اليودى أعلى من ٥٠ ، ولا يزيد كل من رقم رايخرت على ٣ ، ورقم كرشنر على ٢ .

فى الجزء (ب) يكون الرقم اليودى اعلى من ٧٠ ، ولا يزيد كل من رقم رايخرت على ٤.٥ ، ورقم كرشنر على ٢.٥ .

ب – الدهون الحيوانية (غير الخنزير) تتميز بما يلى :

فى الجزء (أ) لا يزيد كل من الرقم اليودى على ٣٠ رقم رايخرت على ٣.٥ ورقم كرشنر على ٢ .

فى الجزء (ب) لا يتجاوز الرقم اليودى ٦٠ ولا يزيد كل من رقم رايخرت على ٣.٥ ورقم بولنسكى على ١.٥ ورقم كرشنر على ٤.٥ .

جـ – تتميز دهون الخنزير فى خليط من الدهون .

فى الجزء (أ) اذا كان الرقم اليودى اعلى من ٥٠ فان زيادة كل من رقم رايخرت على ٣ ورقم كرشنر على ٢ تدل على وجود دهن خنزير . اذا كان الرقم اليودى لا يزيد على ٣٠ فان زيادة رقم رايخرت على ٣.٥ ورقم كرشنر على ٣ تدل على وجود دهن الخنزير

فى الجزء (ب) اذا كان الرقم اليودى أعلى من ٧٠ فان زيادة رقم رايخرت على ٤.٥ ورقم كرشنر على ٢.٥ تدل على وجود دهن الخنزير .

اذا كان الرقم اليودى من ٦٠ – ٦٥ فان زيادة رايخرت على ٣.٥ ورقم كرشنر على ٤.٥ تدل على وجود دهن خنزير .

الفصل السادس

الادمصاص الكروماتوجرافى باستخدام أيون الفضة

Silver ion adsorption chromatography

يعتبر التحليل الكروماتوجرافى باستخدام أيون الفضة من أفضل الطرق لفصل الجلسريدات الثلاثية ، ويستخدم أيون الفضة على نطاق واسع فى الفصل الكروماتوجرافى للتعرف على تركيب الجلسريدات الغير مشبعة فى الليبيدات الطبيعية .

وبدأ إستخدام هذه الطريقة إعتبارا من سنة ١٩٦٢ بواسطة De Vries and Barrett وتبنى هذه الطريقة على أساس الارتباط الضعيف weak interaction بين أيون الفضة والكترونات π للروابط الزوجيه والثلاثية والادمصاص الكروماتوجرافى باستخدام أيون الفضة يتم بنقع أو تشرب نترات الفضة على مادة الادمصاص مثل ح . السيليسيك أو الفلوريزيل Florisil وذلك بعد إختيار أفضل نظام من المذيبات يعطى فصل لليبيدات إلى أقسامها تبعا لعدد الروابط الزوجية فى الجزىء number of double bonds per molecule وبالتالى يمكن إستخلاص الليبيدات المفصوله من المواد الادمصاصية المحتويه على أيونات الفضه بدون تغيير كيماوى Chemical alteration فى نظامها الغير المشبع .

أولا - الطرق Methods

أ - إختيار الطريقة Choice of Method

يستخدم كلا من التحليل الكروماتوجرافى ذو الطبقة الرقيقه TLC والعمود الكروماتوجرافى Column المحتوى على نترات فضة فى فصل الجلسريدات الثلاثية والجدير بالذكر أن إختيار الطريقة المناسبة يعتمد على نوع الفصل المطلوب Resolution desired وكميات amounts المواد المراد فصلها .

١ - طريقة العمود الكروماتوجرافى Column Chromatography

مميزات الطريقة :

١ - تستخدم لفصل كميات كبيرة من العينات تتراوح بين ٨٠ - ١٥٠ ملليجرام .

٢ – إحتمال الاكسدة للجلسريدات ضعيف بواسطة أكسوجين الهواء الجوى .

عيوب الطريقة :

١ – عملية الفصل بطيئة وشاقة Difficult to Monitor .

٢ – يعطى فصل غير حاد Poor resolution أى يحدث تداخل بين المركبات المفصولة.

٣ - طريقة التحليل الكروماتوجرافى ذو الطبقة الرقيقة TLC

مميزات الطريقة :

٢ – تعطى فصل سريع وممتاز .

٢ – أكثر دقة من العمود الكروماتوجرافى .

٢ – سهولة التعرف على الجلسريدات المفصوله .

عيوب الطريقة :

١ – تفصل كميات قليلة Less capacity .

٢ – تكون الجلسريدات أكثر تعرضا للأكسدة بالاكسجين الجوى عن العمود الكروماتوجرافى .

ويفضل الباحثون إستخدام طريقة TLC لسرعتها ودقتها Speed and resolution ويمكن تقليل الاكسدة باتمام كل العمليات فى جو خالى من الاكسجين ومشبع بواسطة النتروجين ويمكن إستخدام من ٢ – ٥ ألواح وبسمك المادة الادمصاصية ١ مم لفصل ٢٠ – ١٠٠ ملليجرام من العينة كما فى حالة العمود الكروماتوجرافى .

ثانيا : التحليل الكروماتوجرافى ذو الطبقة الرقيقة

Thin - Layer chromatography

أ - مواد الادمصاص Adsorbent

يتم تشبع ألواح الفصل بنترات الفضة التى عادة تحضر بخلط حامض السيليسيك مع محلول مائى من نترات الفضة حيث يتم فردها على الالواح وأن إضافة نترات الفضة بتركيز أعلى من ٢٪ (نترات الفضة : حامض سيليسيك = ٢ : ٩٨ وزن / وزن) الى مادة الادمصاص

تعطى نفس كفاءة الفصل لعينة معينه ويعتبر مستوى ٥٪ من نترات الفضة هو التركيز الأمثل والاقتصادى Optimum and economic وأن التركيزات العالية تكون مفيدة لفصل أنواع معينة من الجلسريدات فمثلا ٨٪ نترات الفضة يكون مناسبا لفصل الجلسريدات عالية عدم التشبع highly unsaturated .

كما أن التركيز من ٢٠ - ٣٠٪ نترات الفضة يكون مناسبا لفصل المتشابهات الموضعية Positional isomers التى بها روابط زوجية ويمكن زيادة كفاءة الفصل باضافة محلول ٣٠٪ إيدروكسيد أمونيوم إلى نترات الفضة لان وجود أيون $Ag(NH_3)^+$ يؤدى إلى تكوين معقد أقوى Stronger عن إضافة أيون الفضة بمفردة مع الروابط غير المشبعة . يتم تشرب الواح TLC بنترات الفضه إما عن طريق الرش Spraying أو الغمر Developing ويكون سمك مادة الادمصاص ٢٥ر٠ مم لاغراض التحليل Analytical ومن ٥ر - ١ سمك فى حالة الاغراض التحضيرية Preparative .

مشاكل استعمال نترات الفضة

١ - تسبب تآكل Corrode لجدر الـ Spreader المعدنية .

ويمكن حل هذه المشكلة باستخدام Spreaders مصنوعة من بلاستيك أو زجاج أو الصلب الذى لا يصدأ .

٢ - تفقد مادة الادمصاص المحتويه على نترات الفضة نشاطها inactivated بتعرضها للضوء وللتغلب على هذه المشكلة تخزن مواد الادمصاص بعيدا عن الضوء فى مكان مظلم .

٣ - يجب تنشيط الواح الفصل المحتويه على نترات الفضة بتسخينها لمدة ٢ - ٤ ساعات على ١٩٠ - ١٩٥ مْ بدلا من ١٠٠ - ١٢٠ مْ لمدة نصف ساعة لأن ذلك يؤدى الى فصل عالى Better resolution للجلسريدات الثلاثية ونتيجة لجفاف greater dehydration حامض السيليسيك العالى على ١٩٠مْ يؤدى الى إنخفاض حاد فى تكوين روابط إيدروجينية بين مادة الادمصاص والجلسريدات الثلاثية مما يؤدى إلى تكوين معقد بين الكترونات π لليبيدات غير المشبعة وأيون الفضة .

٢ - المذيبات Solvents

يوجد نوعان من مخاليط المذيبات والتى تستخدم لفصل الجلسريدات الثلاثية باستخدام مادة إدمصاصية محتوية على نترات الفضة .

١ - كلوروفورم يحتوى على صفر - ٦٪ ميثانول أو إيثانول أو أسيتون .

٢ - مخاليط مختلفة من البنزين / إيثير .

والجدول (٢٢) يبين الانظمة المختلفة من المذيبات لفصل الجلسريدات الثلاثية التى تختلف فى درجة عدم التشبع .

جدول(٢٢)

عدد الروابط الزوجية بجزىء الجلسريدات الثلاثية	مخاليط المذيبات كلوروفورم / ميثانول / إيثانول / حامض خليك	بنزين / إثير
صفر - ٤	١٠٠ / صفر الى ٩٩/١	١٠٠ صفر الى ٨٠/ ٢٠
١ - ٦	٩٩.٢ / ٨رالى ٩٨.٥ / ١.٥	٩٠/١٠ الى ٨٠/٢٠
٥ - ٩	٩٧.٥ / ٢.٥	صفر/١٠٠
٧ - ١٢	٩٤/٦	

* يحتوى الكلوروفورم على ٥ر - ١٪ إيثانول كمثبت Stabilizer

٣ - عملية الفصل Separation Procedure

للحصول على الفصل الجيد يجب أن يكون تركيز عينة الجلسريدات الثلاثية قليل فى صورة بقع Spot أو شريط band وفى التحليلات العادية Routine analysis يجب أن يكون قطر البقعة قليل وتوضع بالقرب من الحافة السفلى للوح باستخدام أنبوبة شعرية أو ماصه دقيقة Micro syringe ويتم وضع الجلسريدات المذابة فى مذيب مناسب ويكون تركيزها ٣ - ٣٠ ميكروجرام على اللوح .

وللعمل التحضيرى Preparative work يستخدم ٣٠ - ١٠٠ ملليجرام من الجلسريدات الثلاثية وتفصل developed على ألواح أبعادها ٢٠ × ٢٠ سم أو ٢٠ × ٤٠ سم بسمك ١ مم من المادة الادمصاصية .

توضع الالواح فى حجرة الكروماتوجرافى القياسية المحتوية على المذيب المناسب التى سبق إمرار تيار من النيتروجين داخلها لازاحة الاكسجين لمنع الاكسدة وتكرار خطوه الفصل بنفس الطور المتحرك يعطى فصل أفضل وبعد تمام الفصل تجفف الواح TLC بواسطة تيار من النيتروجين ويتحدد Locate مواضع الجلسريدات الثلاثية TG بعدة طرق وأكثر الطرق التى لا تسبب تكسير أو تغير فى المركبات non-destructive هى طريقة الرش بمحلول ٢.٧ ثنائى

كلوروفلورسين ٠،٥٪ فى الميثانول / ماء - (٥٠/٥٠) ثم تعرض Viewing للاشعة فوق البنفسجية فتظهراللبيدات كنقط صفراء على أرضية قرمزية وكذلك استخدام رودامين 6G ثنائى بروموفلورسين وصوديوم فلورسين للتعرف على المركبات المفصولة .

- وتشمل الطرق التى تغير فى التركيب الكيماوى Destructive methods لتحديد مواضع الجلسريدات الثلاثية على ما يلى :

- إستعمال اللهب بامراره على أماكن الجلسريدات الثلاثية .

- الرش بحامض فوسفوريك ٥٠٪ أو حامض كبريتيك ٥٠٪ ثم التسخين على درجة ٢٠٠ - ٤٠٠ مْ .

لا يستخدم بخار اليود فى التعرف على المركبات المفصوله باستخدام نترات الفضة لان اليود يتفاعل مع أيون الفضة ويعطى اللوح كله لون اصفر (AgI) وبالتالى يصعب التعرف على المركبات المفصولة .

التقدير الكمى Quantitation

يمكن إجراء التقدير الكمى للمركبات المفصولة على الواح TLC بطريقتين :

١ - على اللوح Chromatoplate نفسه بحساب مساحة البقعة بجهاز البلانيمتر أو Photodensitometry .

٢ - تكشط البقع بعد إظهارها ثم تقديرها بأى من الطرق الكمية .

وتفضل الطريقة الاخيرة حيث أنه بعد التعرف على الجلسريدات يتم معرفة تركيب الاحماض الدهنية فى كل جلسريد وبعد كشط البقع ونقلها فى أنبوبة إختبار تستخلص الجلسريدات بواسطة إيثير وتعامل بأيون الكلوريد لكى يكسر الروابط بين أيون الفضة والرابطة الزوجية للجلسريدات الغير المشبعة .

وفيما يلى خطوات طريقة Hill et al (1986) لفصل وتقدير الجلسريدات :

١ - يرش لوح TLC بمحلول ١٪ ٢، ٧ - ثنائى كلوروفلورسين ثم يعرض لاشعة فوق البنفسجية UV لاظهار مناطق الجلسريدات الثلاثية .

٢ - تكشط Scrap كل منطقة وتوضع فى أنبوبة إختبار ويضاف اليها محلول ١٪ كلوريد صوديوم فى محلول من الميثانول / الماء ٩٠ : ١٠ حجم / حجم ويضاف المحلول تدريجيا

بمعدل ٥ر سم^3 تقريبا مع الرج حتى إختفاء اللون الاحمر الناتج من إرتباط أيون الفضة مع ثنائى كلوريد الفلورسين .

٣ - يضاف ٥ سم^3 من الاثير / ميثانول (٩٠/١٠ حجم/ حجم) وكذلك ١ ملليجرام BHT لكل لتر لاستخلاص الجلسريدات .

٤ - تفصل مادة الادمصاص بواسطة الطرد المركزى .

٥ - يرشح decant وتغسل مادة الادمصاص مرتين باستعمال ٤ سم^3 من المذيب المستخدم فى كل مرة .

٦ - يبخر المذيب فى جو من النتروجين .

٧ - يمكن تقدير الجلسريدات الثلاثية كميا باستعمال جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى G.L.C. باستخدام مادة قياسية داخلية Internal Standard أو بالتفاعلات اللونية باستخدام حامض كروموتروبيك chromotropic acid أو حامض الهيدروكساميك hy- droxamic acid أو بواسطة جهاز الامتصاص فى منطقة الاشعة تحت الحمراء Infrared spectrophotometry .

ثانيا : الفصل باستخدام العمود الكروماتوجرافى

Column chromatography

ا - مواد الادمصاص Adsorbents

تحضر مادة الادمصاص المحتوية على أيون الفضة فى العمود الكروماتوجرافى من حامض السيليسيك فى محلول نترات الفضة كما يلى :

١ - يعلق ١٠٠ جم من حامض السيليسيك المتجانس فى ٢٠٠ سم٣ من محلول نترات الفضة ٥٠٪ (وزن / حجم) .

٢ - يسخن المخلوط على ١٠٠ مْ لمدة نصف ساعة ثم يبرد المحلول ويرشح ثم يجفف على ١٢٠أم لمدة ١٦ ساعة ويحفظ .

وبهذه الطريقة يحتوى حامض السيليسيك على ٣ر - ٤ر جم نترات فضه / جم مادة إدمصاصية ويتم تنشيط المادة الادمصاصية على ١٩٥مْ بدلا من التسخين على ١٢٠ مْ حيث تعطى فصل أفضل كما فى حالة TLC .

٢ - المذيب Solvent

يفصل مخلوط الجلسريدات الثلاثية بواسطة العمود الكروماتوجرافى المحتوى على أيون الفضه المتحد مع حامض السيليسيك باستخدام مذيبات تتدرج فى قطبيتها ويستخدم مخلوط من المذيبات التالى :

إثير البترول / بنزين / الاثير فى الفصل .

والجدول (٢٣) يوضح تدرج القطبية لاستخلاص الجلسريدات الثلاثية المحتوية على روابط زوجية من صفر حتى ٤ روابط زوجية .

جدول(٢٣)

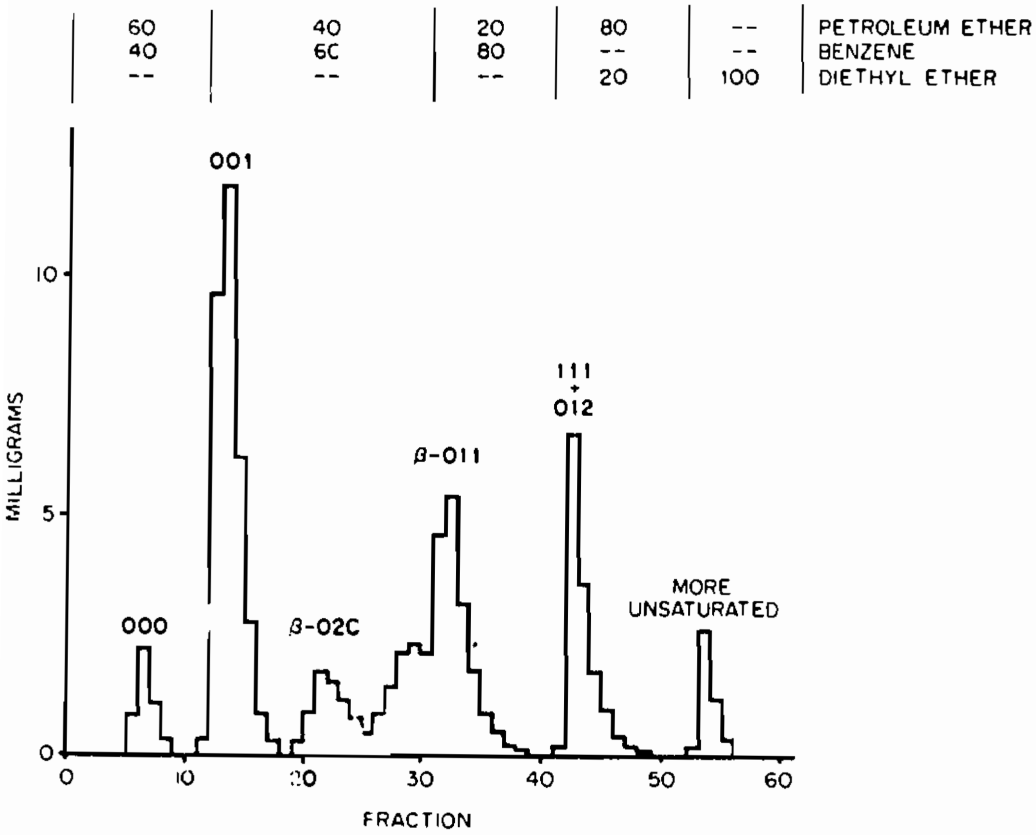
عدد الروابط الزوجية فى الجلسريدات الثلاثية	المذيب	حجم/حجم
صفر	إثير البترول/ بنزين	٤٠/٦٠
١	إثير البترول/ بنزين	٥٥/٤٥
٢	إثير البترول/ بنزين	٨٠/٢٠
٣	إثير البترول/ اثير أو بنزين	٢٠/٨٠
٤	إثير	

ودلت النتائج أنه باستخدام العمود الكروماتوجرافى لم ينجح فى فصل الجلسريدات الثلاثية المحتوية على أكثر من ٤ روابط زوجية فى الجزىء .

٣ - طريقة الفصل Separation procedure

يعبأ العمود بواسطة ١٠ - ٢٠ جم من حامض سيليسيك المحتوى على نترات فضة والمعلق فى إثير البترول ، وهذا العمود يكون كافيا لفصل ٨٠ - ١٨٠ ملليجرام من مخلوط الجلسريدات الثلاثية فى عمود أبعاده ١١ × ١٨مم ويراعى تغطية Wrapped الأعمدة بورق أسود أو ورق ألومنيوم لحماية المادة الادمصاصية من الضوء .

والشكل التالى يوضح عملية فصل الجلسريدات الثلاثية باستخدام الاعمدة فى وجود أيون الفضة وحامض السيليسيك :



التقدير الكمى Quantitation

من الطرق الواسعة الانتشار للتقدير الكمى هى تبخر المكونات Fractions فى أنابيب معلومة الوزن tared ثم يعاد وزنها بعد التبخير . ولكن هذه الطريقة شاقة tedious ومن الطرق المستعملة هو التقدير المباشر لكمية من كل مكون Fraction باستخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى GLC أو باستخدام جهاز تقدير مساحة البقع Densitometery بأن توضح كمية aliquot من كل مكون على لوح TLC ثم حرقها Charred بدون اجراء عملية الفصل development .

ثالثا : التطبيقات Applications

١ - الفصل على أساس عدد الروابط الزوجية فى الوضع المضاهى

Separation by number of cis double bonds

أ - تعاقب الفصل Elution Order

يظهر الترتيب التالى تتابع فصل خليط الجلسريدات الثلاثية باستخدام مادة إدمصاصية محتوية على أيونات الفضة - وتحتوى الجلسريدات المختلطة على أحماض دهنية مشبعة ، أحادية الروابط الزوجية (١) اللينوليك (٢) ، اللينولينيك(٣).

قمة اللوح

000	001	011	002	111	212	112	
220	003	122	013	222	113	023	123
223	033	133	233	333			

أسفل اللواح

يتضح من القائمة السابقة بأن تعاقب الفصل لا يكون معتمدا فقط على عدد الروابط الزوجية فى الوضع Cis بل يعتمد أيضا على عامل آخر وهو أن قوة إرتباط أيون الفضه يكون أقوى عندما تكون الروابط الزوجية متراصة clustared فى سلسلة حامض دهنى واحد عما إذا كانت موزعة divided على عدد من سلاسل الاحماض الدهنية فمثلا سلسلة حامض اللينوليك يكون مركب أقوى إرتباط Stronger complex مع أيونات الفضة عن الارتباط مع سلسلتين لحامض الاوليك (110-200) وكذلك فان ٣ روابط زوجية فى سلسلة واحدة ١٨ : ٣ يعطى مركب أقوى إرتباط مع أيونات الفضة من ٤ روابط زوجية موزعة فى سلسلتين ١٨ : ٣ (002-003) .

وقوة الارتباط π complexing power يمكن التنبىء بها خلال قيم توقعية arbitrary values لقوة المركب لكل سلسلة حامض دهنى وهى كما يلى :

صفر	=	مشبعة
١	=	رابطة زوجية واحدة
٢ + أ	=	رابطتين زوجيتين
٤ + ٤ أ	=	٣ روابط زوجية

حيث أن (a) > ١

وعلى ذلك فان الجلسريد الذى تركيبه 033 به ٦ روابط زوجية يكون معقد ذو قوة 8a + 8 وهذه تكون أقوى إرتباط من 322 حيث تكون قوة الارتباط للمركب 6a + 8 على الرغم من أن هذا المركب يحتوى على ٧ روابط زوجية .

وبالرغم من أن عملية الفصل تعتمد أساسا major separation characteristics على تكوين معقد ما بين الجلسريد الغير المشبع وأيون الفضة فان هناك ٣ عوامل أخرى ثانوية minor factors تؤثر على قيمة R_f للجلسريدات الثلاثية .

١ – الاحماض الدهنية طويلة السلسلة لها قيمة R_f أعلى من الاحماض الدهنية قصيرة السلسلة . وينشأ ذلك من ضعف إدمصاصها poorer adsorption على حامض السيليسيك وتظهر هذه الصفة بوضوح فى العينات المحتوية على أحماض دهنية قصيرة السلسلة أقل من C14 وطويلة السلسلة أعلى من C20 .

٢ – موضع الرابطة الزوجية position of a double bond على سلسلة الحامض الدهنى لها تأثير على درجة فصل الجلسريدات الثلاثية .

٣ – الوضع الهندسى positional isomers للجلسريدات الثلاثية (المشابهات) فمثلا B-001، B-010 و B - 002 ، B - 020 لها أيضا تأثير على درجة الفصل حيث أن الجلسريدات المتناسقة لها قيمة R_f أعلى من غير المتناسقة Asymmetric .

الفصل باستخدام الطبقة الرقيقة TLC

يمكن فصل مخلوط من الجلسريدات الثلاثية الذى يحتوى من ٥ – ١٠ روابط زوجية على لوح واحد من TLC وفى حالة المخاليط الاكثر تعقيدا يكون من الضرورى الفصل مرتين مستخدما مذيبات مختلفة فى درجة القطبية .





والشكل (أ) يوضح فصل TG من 001 الى 222 والشكل (ب) يوضح تتابع فصل الجلسريدات من 001 الى 222 .

ويلاحظ أن قوة الفصل Resolution تقل مع زيادة عدم التشبع فى الجلسريدات الثلاثية حيث تفصل الجلسريدات الثلاثية من 000 الى 222 كشرائط منفصله Single bands ولكن عندما يحتوى الليبيد على C18:3 فان الجلسريدات الثلاثية من 222 إلى 333 يكون فصلها جزئى Partially resolved وأن الجلسريدات الثلاثية المفصوله بالطريقه التحضيريه تعطى مكونات Fractions عباره عن مخاليط ثلاثيه ورباعية من أقسام الجلسريدات الثلاثيه ternary or quaternary mixtures وعلى ذلك فان إستخدام مادة إدمصاصية تحتوى على أيون الفضة فى TLC يكون مفيدا فى فصل الدهون المشبعة مثل السمن الصناعى .

استخدامات العمود الكروماتوجرافى Column chromatography

يفصل العمود الكروماتوجرافى المحتوى على أيونات الفضة الجلسريدات الى ٦ أقسام فقط وهى الجلسريدات الاكثر فى عدم التشبع 012 + 111 ,011 ,002 ,001 ,000 والمحاولات التى بذلت حتى الآن لفصل مخاليط TG عالية عدم التشبع لم تنجح باستخدام العمود الكروماتوجرافى .

أولا : فصل المشابهات Isomer Separation

يمكن فصل ٤ أنواع من مشابهات الجلسريدات الثلاثية باستخدام الطرق الكروماتوجرافية المحتوية على أيون الفضة وهى :

أ - فصل الجلسريدات التى تحتوى على روابط زوجية فى أى موضع فى داخل جزىء الجلسريد الثلاثى Isomeric positioning of double bonds within the triglyceride molecule

مثال : يحدث فصل ممتاز لأزواج الجلسريدات التالية :

020 - 011, 111 - 012 , 022 - 013

ب - فصل المتشابهات التى تحتوى على روابط زوجية فى مواضع مختلفة داخل سلسلة حامض دهنى واحد Isomeric positioning of double bonds with-in a single fatty acid chain

مثال : يمكن فصل المتشابهات أوليك (9c) 18:1 عن البتروسيلينيك (6c) 18:1 بتكرار الفصل ٣ مرات عند درجة حرارة - ٢٢ْم .

يمكن فى بعض الاحيان فصل بعض المتشابهات التى تختلف فى :

موضع الرابطة الزوجية وطول سلسلة الحامض الدهنى أى جميع ما ذكر فى أ ، ب مثال ذلك يمكن فصل الجلسدريدات : (16:1 (ω9) - 18:1 (ω11) - 18:1 (ω9) - 20:1(wω11

ثانيا : فصل متشابهات الجلسريدات طبقا للتوزيع الفراغى للروابط الزوجية Geometric isomers of double bonds

تكون الجلسريدات الثلاثية التى تحتوى على روابط زوجية فى وضع مخالف trans مع الكترونات π أضعف من مثيلتها التى تحتوى على روابط زوجيه فى وضع مضاهى Cis وعلى

ذلك يمكن فصل المتشابهات المضاهية والمخالفة بواسطة الادمصاص الكروماتوجرافى المحتوى على أيون الفضة فمثلا يمكن فصل متشابهات الجلسريدات الثلاثية المحتوية على أوليك (18:1,9c) وإليايديل (18:1, 9t) عن طريق هذه الطريقة الكروماتوجرافية وتعتبر طرق فصل المتشابهات المضاهية والمخالفة ذات أهمية كبيرة عند تحليل الدهون المهدرجة .

ثالثا : فصل متشابهات الاحماض الدهنية المؤستله بالجلسرول

Isomeric esterification of fatty acids to glycerol

يمكن بسهولة فصل أزواج الجلسريدات الثلاثية التالية: B:020 - 002 , B : 101 - 011 , B : 010 - 001 , بواسطة كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة المحتوية على أيون الفضة – فالمتشابهات المتناسقة symmetrical isomers لها قيمة R_f أعلى فى كل نوع من الجلسريدات الثلاثية المذكورة .

يعتبر فصل المتشابهات بواسطة الادمصاص الكروماتوجرافى المحتوى على أيون الفضة ذات قيمة كبيرة عندما تحتوى الجلسريدات الثلاثية على عدد قليل نسبيا من الروابط الزوجية Relatively few double bonds والجدير بالذكر أن المتشابهات التى تختلف فى طول سلاسل الاحماض الدهنية (Sn - PPP وSn - MPSt) والمتشابهات الضوئية Snو Sn-POL) - OPL) للجلسريدات الثلاثية لا يمكن فصلها بهذه الطرق الكروماتوجرافية .

مشتقات الجلسريدات الثنائية : Derived diglycerides

يمكن فصل الجلسريدات الثنائية الناتجة من الازالة الاختيارية Selective deacylation للاحماض الدهنية الناتجة من الجلسريدات الثلاثية أو من إزالة مجموعة الفوسفات Dephos-phorylation من الفوسفوليبيدات بواسطة الادمصاص الكروماتوجرافى المحتوى على أيون الفضة ، وعلى الرغم من أنه يمكن إستخدام الجلسريدات الثنائية الحره لاجراء عملية الفصل الا أنه يفضل إجراء عملية أستلة للموضع الخالى من الاحماض الدهنية لمنع تكوين المتشابهات isomerization التى تنتج من إنتقال أسيل الحامض الدهنى ، ويمكن بسهولة الحصول على فصل عالى لمتشابهات الجلسريدات الثنائية الأصلية وهى : Sn - 2,3 و Sn - 1,3 نظرا لأن هذه المتشابهات تدمص بدرجات مختلفة adsorbed differently باستخدام حامض السيليسيك .

وفيما يلى تعاقب فصل خلات الجلسريدات الثنائية :

أعلى اللوح

00Ac, 01Ac, 11Ac, 02Ac, 12Ac, 22Ac,
03Ac, 04Ac, 14Ac, 05Ac, 06Ac, 24Ac, {15Ac, {55Ac, 56Ac, 66Ac}

أسفل اللوح

وأنه من المدهش حقا أننا نجد 06 Ac له قيمة R_f أعلى من 24 Ac و 15 Ac نظرا لان ارتباط أيون الفضه مع الكترونات π للروابط الزوجية يكون أقوى عندما توجد الروابط الزوجية الثنائية أو الثلاثية مجتمعه فى سلسلة واحدة لحامض دهنى عما أن تكون هذه الروابط غير المشبعة موزعه على سلاسل الأحماض الدهنية .

تفاعلات الازالة الجزئية لاسيل الاحماض الدهنية

Partial Deacylation Reactions

بعد فصل مخلوط الجلسريدات الثلاثية بالطرق الكروماتوجرافية السابق ذكرها فانه يمكن الحصول على معلومات اضافية عن تركيب تلك الجلسريدات الثلاثية باستعمال تفاعلات الازالة الجزئية للأحماض Partial Deacylation وتستخدم مشتقات الجلسريدات الثنائية والاحادية (mono and diglycerides) فى ٣ أنواع من التحليلات وهى

١ - بعد فصل الجلسريدات الثنائية بالطرق الكروماتوجرافية العادية يمكن مطابقة تركيبها بتركيب الجلسريدات الثلاثية فى العينة الاصلية .

٢ - من تحليل الاحماض الدهنية للجلسريدات الثنائية والاحادية يمكن معرفة توزيع هذه الاحماض على المواضع ٢ - و ١ ، ٣ مجتمعا .

٣ - تستخدم الجلسريدات الثنائية الناتجة من عملية ازالة الاحماض الدهنية (deacylation) لمعرفة التوزيع الفرغى للاحماض الدهنية الداخلة فى تركيبها وخاصة معرفة الاحماض التى تشغل الاماكن ١ و ٣ .

وتتم عملية الازالة الاختياريه للأحماض الدهنية (Selective deacylation) فى الجلسريدات الثلاثية بطريقتين هما :

١ - إستخدام طريقة إنزيمية (انزيم الليباز (Pancreatic lipase) .

٢ - إستخدام طريقة كيماوية (معقد جرينيارد (Grignard reagent) .

الشروط الواجب مراعاتها عند إجراء عملية إزالة الاحماض الدهنية (deacylation)

١ - يجب أن تكون الجلسريدات الاحادية والثنائية الناتجة من الازاله الجزئية مماثلة representative للجلسريدات الثلاثية الاصلية من حيث إحتلال الاحماض الدهنية لاماكن معينة أى يجب أن تكون الاحماض الدهنية التى تحتل المواضع ١ ، ٣ فى الجلسريدت الثلاثى الاصلى هى نفسها الموجودة فى المواضع ١ ، ٣ فى الجلسريد الثنائى .

٢ - يجب ألا تظهر الجواهر الكشافه التى تستخدم فى عملية إزالة الأحماض الدهنيه (deacy lation) أى تخصص تجاه نوعية معينة من الأحماض الدهنية أو الجلسريدات الثلاثية .

٣ - يجب ألا تشجع انتقال لمجاميع الاسيل (Acyl) أى تحرك الاحماض الدهنية من ١ الى ٢ أو من ٣ الى ٢ .

أولا : الطرق الكيماوية لإزالة مجاميع الاسيل

Chemical Deacylation Methods

مركب جرينيارد Grignard reagent

إن معظم الطرق المستخدمة لانتاج جلسريدات ثنائيه يشابه أو يماثل الجلسريدات الثلاثية هى الطرق التى تعمل على إزالة مجاميع الاسيل بواسطة مركب جرينيارد ، يتفاعل مركب جرينيارد مع رابطة إستر واحدة فى جزئى الجلسريد الثلاثى ويعطى بعد التحليل المائى جلسريد ثنائى وكحول ثالث يحتوى على مجموعة الاسيل المفصولة ، وتستمر عملية نزع مجاميع الاسيل بحيث يحتوى نواتج التفاعل على متشابهات الجلسريدات الثنائية والاحادية والجليسرول وأحماض دهنيه .

ويوقف التفاعل باضافة حامض الخليك عند النقطة التى يصل فيها انتاج الجلسريدات الثنائية الى أقصى تركيز ويفضل استخدام ايثايل بروميد الماغنسيوم (CH3 CH2 MgBr) Ethyl Magnesium Bromide كجوهر كشاف لهذا التفاعل لانه يعطى كحول ثالث يسهل فصله من الجلسريد الثنائى بطرق الفصل الكروماتوجرافى لنواتج التفاعل .

وفيما يلى خطوات الطريقة التى ذكرها Christie and Moore (1969)

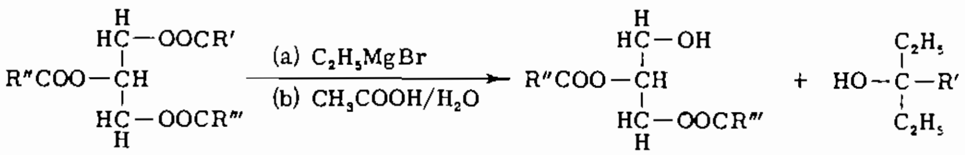
الطريقة :

تذاب ٤٠ ملجم من الجلسريدات الثلاثية فى ٣سم٣ اثير جاف + ١ سم٣ محلول جرينيارد (تركيزه ٠.٥ مول فى الاثير حديث التحضير) ويرج المخلوط لمدة ٦٠ ثانية - يضاف ٠.٠٥ سم٣ حمض خليك ثلجى ثم ٢سم٣ ماء لوقف التفاعل وتستخلص النواتج الدهنية بواسطة الاثير .

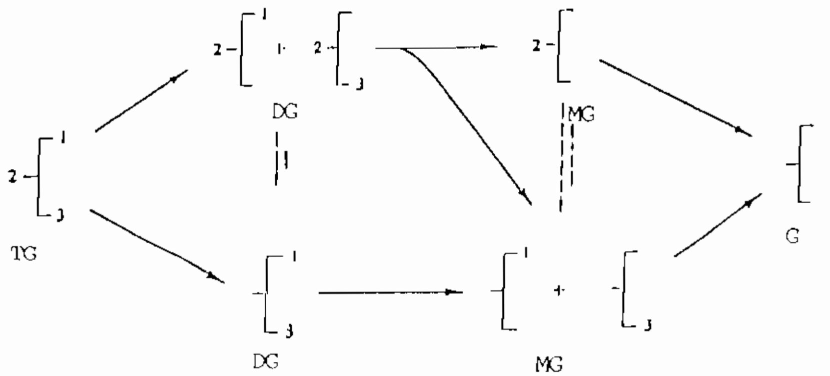
يغسل المستخلص أولا بمحلول مائى مخفف من بيكربونات البوتاسيوم ($KHCO_3$) ثم يغسل بالماء ويجفف الناتج فى النهاية على كبريتات الماغنسيوم ($MgSO_4$) وبعد التخلص من المذيب يتم فصل الجلسريدات الثنائية بسرعة على الواح T.L.C. (المادة الدعامية هى حمض السيليسيك محتويه على ٥٪ (وزن / وزن) حامض بوريك وذلك لمنع هجرة مجاميع الاسيل .

ويستخدم المذيب الآتى : هكسان / ايثير (٥٠/٥٠ – حجم / حجم) لفصل الجلسريدات الثنائية (2,3) sn - 1,2 و sn - 1,3 - عن بعضها البعض .

وفيما يلى المعادلات التى تبين ميكانيكية هذا التفاعل :



والرسم التخطيطى التالى يبين تفاعل معقد جرينيارد مع الجلسريد الثلاثى :



نواتج الجلسريدات الثنائية Diglyceride products

تعطى عملية إزالة مجاميع الاسيل بواسطة مركب جرينيارد الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ – (٢ ، ٣) و (١ ، ٣) والنسبة بينهما هى ٢ : ١ تقريبا .

والتحليل المباشر للجسريد الثنائى ١ ، ٣ يعطى تركيب الاحماض الدهنية الموجودة فى المواضع ١ و ٣ – ويعرف نوع الحامض الدهنى الذى يشغل الموضع ٢ بالفرق كما فى المعادلة التالية :

٪ للحمض الدهنى فى الوضع ٢ = ٣ (٪ الاحماض الدهنية الكلية فى الجلسريد الثلاثى)-(٪ الاحماض الدهنية للجسريد الثنائى ١ ، ٣) .

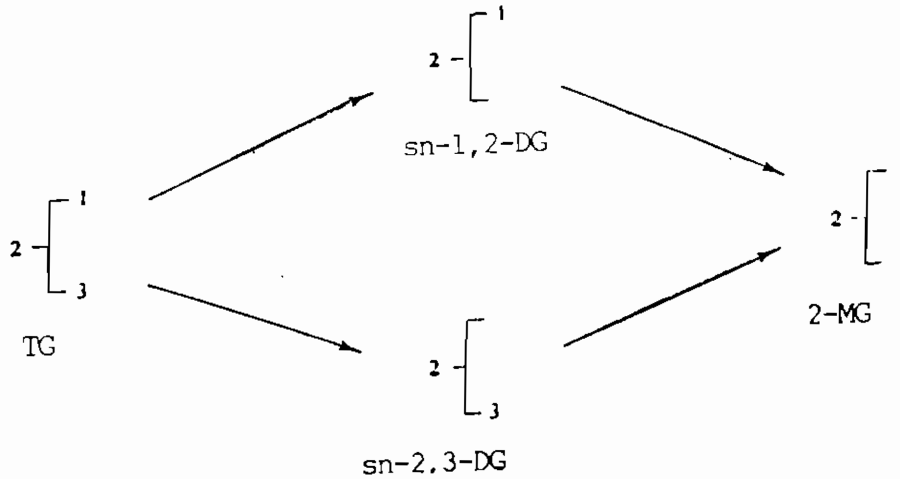
نواتج الجلسريدات الاحادية Monoglyceride products

لا يمكن استخدام الجلسريدات الاحادية sn - 3 و sn - 1 و sn - 2 الناتجة من تفاعل مركب جرينيارد مع الجلسريدات الثلاثية فى الأغراض التحليلية وذلك لأن الاحماض الدهنية الموجودة بالجلسريدات الاحادية لا تماثل الاحماض الدهنية not representative التى تحتل مواضع معينه فى الجلسريدات الثلاثية الأصلية نظرا لحدوث عملية انتقال الاحماض الدهنية من مواضعها الاصلية الى مواضع اخرى .

ثانيا : الطرق الانزيمية لإزالة مجاميع الاسيل

Enzymatic deacylation methods

يعمل انزيم بنكرياس الليباز على تحليل رابطة استر أول فى جزىء الجلسريد الثلاثى ويعطى جلسريدات ثنائية من نوع (١ ، ٢) و (٢ ، ٣) ويعطى ٢ - جلسريد أحادى وكذلك أحماض دهنية حرة Free Fatty Acids .



وهذا الانزيم متخصص ويكاد يكون تخصصه مطلق لتحليل رابطة الاستر فى المواضع ١ و ٣ وتستخدم الجلسريدات الأحادية الناتجة من التحليل الانزيمى على نطاق واسع لمعرفة نوع الحامض الذى يشغل الوضع (٢) وعلى ذلك تستخدم نواتج التحليل الانزيمى لمعرفة توزيع وتحديد أماكن تلك الاحماض فى الدهون الطبيعية .

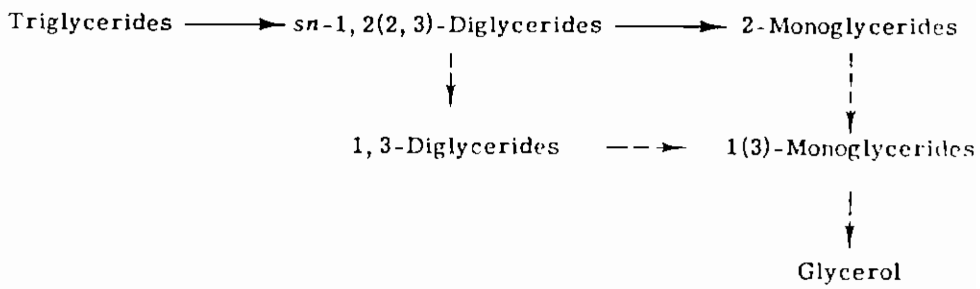
ا - الانـزيـم Enzyme

يستعمل بنكرياس الخنزير على نطاق واسع كمصدر لانزيم الليباز Pancreatic lipase ويمكن الحصول عليه فى صورة مسحوق powder وذلك عن طريق نزع الماء ونزع الدهن من البنكرياس (بنكرياس الخنزير) بواسطة الاسيتون والاثير ويكون الناتج بهذه الطريقة ثابت لمدة طويلة ويصاحب المستحضر الانزيمى كميات صغيرة من نوعين من الانزيمات غير المرغوبة فى وجودها وهما :

١ – Esterase يعمل على تحليل رابطة الاستر للمركبات الذائبة فى الماء .

٢ – Non - specific lipase يعمل على تحليل الاسترات الغير ذائبة فى الماء سواء الناتجة من الكحولات الاولى أو الثانية .

وهذا الانزيم الغير متخصص يعطى نسبة قليلة من الجلسريدات الثنائية من نوع (١ ، ٣) والمفروض ان تنتج جلسريدات ثنائية من نوع (١ ، ٢) و (٢ ، ٣) كذلك يعطى نسبة قليلة من الجلسريدات الاحادية من نوع (١ –) أو (٣ –) والمفروض أن ينتج فقط جلسريد احادى من نوع (٢ –) وتتكون كل هذه المكونات إذا وجدت هذه الانزيمات مع إنزيم ليباز البنكرياس Pan-creatic Lipase أثناء إزالة مجاميع الاسيل من الجلسريد الثلاثى ويتضح ذلك من هذا الرسم التالي :



ويمكن وقف نشاط إنزيم الليباز الغير متخصص Non - specific lipase بدون حدوث فقد فى نشاط إنزيم ليباز البنكرياس Pancreatic كما يلى :

١ – يتم التحليل فى غياب أملاح الصفراء Bile salts

٢ – يحدث لانزيم ليباز البنكرياس Pancreatic lipase هضم ذاتى Self - digestion على pH – ٩ ودرجة حرارة ٤٠مْ ولمدة ساعة .

٣ – يعامل إنزيم الليباز Pancreatic lipase بمحلول ثنائى إيثايل بارا نيتروفينايل فوسفات diethyl - p-nitrophenyl phosphate بتركيز ٠,٠٠٠٥ مولر ولمدة ساعة .

٣ – ظروف التفاعل Reaction conditions

تختار ظروف التفاعل بحيث تتم عملية إزالة مجموعة الاسيل للحامض الدهنى بسرعة كبيرة (أقل من ٩٠ ثانية) ومنع هجرة مجاميع الاسيل الغير مرغوبة باكبر قدر ممكن للجلسريدات الجزيئية (ثنائية وأحادية) والظروف المثلى لتفاعل انزيم ليباز البنكرياس المستخلصة من الخنزير هى :

١ – درجة الحوضة قريبة من ٨ .

٢ – الكتروليت تركيزه ٠,٥ – ١,٥ مولر .

٣ – وجود أيونات الكالسيوم .

٤ – نسبة الانزيم الى العينة كبيرة .

٥ – إثارة قوية (Vigorous agitation) .

٦ – وجود مستحلبات (أملاح الصفراء) لمزج هذه المكونات مع بعضها ولزيادة مساحة الاسطح المتداخله .

٧ – درجة حرارة التفاعل هى ٣٧ – ٤٠مْ وعلى هذه الدرجة تتم عملية إزالة أسيل الحامض الدهنى Deacylation بسرعة بدون تغير فى تركيبها الكيماوى كما أن الجلسريدات الثلاثية توجد فى الحالة السائلة عند اجراء التفاعل " ما عدا الجلسريدات الثلاثية المشبعة تماما".

وفيما يلى طريقة Luddy et al (1964) التى تستخدم فى إزالة الاحماض الدهنية للجلسريدات الثلاثية بواسطة إنزيم الليباز .

١ – توزن ٥٠ ملجم عينه جلسريد ثلاثى فى أنبوبة ويضاف كمية كافية من الانزيم (٩ ملجم) لاتمام عملية التحليل .

٢ – يضاف ١ سم٣ محلول منظم (Tris) تركيزه ١ مولر ذو درجة حموضة ٨ بالضبط ثم يضاف ١ سم٣ محلول كوريد كالسيوم (٢٢٪) ثم يضاف ٢٥سم٣ محلول أملاح صفراء (١٪) .

٣ – تسخن محتويات المخلوط فى حمام مائى على درجة حرارة ٤٠مْ لمدة ١ دقيقة بدون رج .

٤ – تغطى الانبوبة ويرج لمدة ٤٥ – ٩٠ ثانية بمعدل ٣٠٠٠ ذبذبة/ دقيقة .

٥ – فى نهاية زمن التفاعل ينقل المخلوط فى الحال الى قمع فصل ويستخلص بواسطة الاثير ويوقف التحليل الانزيمى عن طريق إضافة ٠.٥ سم٣ حامض HCl ٦ ع .

٦ – يغسل المستخلص بالماء ويجفف فوق كبريتات صوديوم لا مائية – يرشح ثم يبخر المذيب .

٧ – تفصل بسرعة نواتج التفاعل على ألواح TLC والمادة الدعامية المستخدمة هى حامض السيليسيك المدعمة – بـ ٨٪ (وزن / وزن) حامض بوريك لمنع حدوث انتقال الاحماض الدهنية .

٣ – التخصص Specificity

١ – تعتبر قدرة إنزيم ليباز البنكرياس على التخصص التحليلى قريبة من المطلقة (اكبر من ٩٧٪) وهذا التخصص يعنى تحليل رابطة الاستر الأولى الموجودة فى الموضع (١) أو (٣) فى جزئى الجلسريد الثلاثى ولا يبدأ فى تحليل رابطة الاستر الثنائية الا بعد الانتهاء من تحليل مجاميع الاستر الاولى . ويلاحظ أن انفراد الحامض الدهنى الموجودة فى الوضع (٢) يكون مصدره أو ينسب الى هجرة مجموعة الاسيل . يهاجم إنزيم ليباز البنكرياس كل من الموضعين (الاستر الاولى) (١) ، (٣) بنفس المعدل على جزئى الجلسريد الثلاثى أى أن هذا الانزيم لا يميز فى تحليله لرابطة الاستر فى الموضع (١) ، أو (٣) اذا كان الحامض الدهنى المرتبط فى (١) هو نفس الحامض المرتبط فى الوضع (٣) .

٢ – يحلل هذا الانزيم الاحماض الدهنية الغير المشبعة بسرعة اكبر من الاحماض الدهنية المشبعة إذا تساوت طول السلسلة فى كل منهما . وعلى ذلك يقوم انزيم الليباز بتحليل الجلسريد الثلاثى الذى يحتوى على أوليك فى الوضع (١) ، وأحماض إستياريك فى المواضع (٢ ، ٣) ويعطى جلسريد ثنائى الاستيارين فهذا يدل على أن الانزيم يعمل على تحليل الحامض الدهنى أوليك أولا (١) ويعطى جلسريد ثنائى عبارة عن ثنائى إستيارين .

٣ – لا يميز هذا الانزيم فى تحليله بين المشابهات المضاهية والمخالفة حيث أوضحت الدراسات المقارنة بين الجلسريدات التى تحتوى على حامض الاوليك الذى يحتوى على رابطة زوجية

فى وضع مضاهى (9C) والالياديك الذى يحتوى على رابطة زوجية فى وضع مخالف (9t) . فان الإنزيم لا يميز بينهما فى تحليل الجلسريدات الثلاثية .

٤ - يحلل هذا الانزيم الاحماض الدهنية التى تحتوى على رابطة زوجية ، تفرعات الالكيل أو مجاميع فعالة أخرى على ذرات الكربون ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ بدرجة أبطأ من مشابهاتها التى تحتوى على مجاميع فعالة ترتبط بذرات كربون بعيدة عن رابطة الاستر وهذا يرجع الى إعاقة هذه المجاميع عمل الانزيم التحليلى .

٥ - يفضل إنزيم الليباز تحليل الاحماض الدهنية طويلة السلسلة بدرجة أكبر من الاحماض الدهنية قصيرة السلسلة بدليل أنه عند تحليل الجلسريد الثلاثى PBB يعطى نوعين من الجلسريدات الثنائية وهى ثنائى البيوترين ، بالميتوبيوترين إلا أن نسبة النوع الأول أعلى بمقدار أكثر من الضعف بالمقارنة بالجلسريد الآخر .

التعرف على توزيع الاحماض الدهنية فى الجلسريدات الثلاثية

Stereospecific analysis

تستخدم الطرق الكيماوية والانزيمية كما سبق ذكره للتعرف على الاحماض الدهنية المرتبطة بروابط إستر فى الوضع ٢ والمتحدة فى المواضع ١ و ٣ وللتعرف على الاحماض الدهنية فى المواضع ١ و ٣ كل على حده يلزم اجراء التحليل الكامل باستخدام التحليل **التخصصى الفراغى** Stereospecific analysis .

الطرق Methods

تشمل طرق التحليل التخصص الفرغى للجلسريدات الثلاثية على ٣ تفاعلات أساسية :

١ - تحليل الجلسريدات الثلاثية إلى جلسريدات ثنائية مشابه لتركيب الجلسريدات الثلاثية .

٢ - إجراء عملية فسفرة للجلسريد الثنائى وإنتاج فوسفوليبيد .

٣ - تحليل الفوسفوليبيد باستعمال إنزيم الفوسفوليباز A .

وبعد كل تفاعل تفصل النواتج باستخدام TLC ثم التعرف على تركيب الحامض الدهنى عندما يكون ذلك ضروريا .

أ - طريقة بروكرهوف للجلسريد الثنائى ١، ٢ - و ٢، ٣ -

Sn - 1,2 - ; 2,3 - DG of Brockerhoff : (Brockerhoff, 1967)

١ - تشمل الخطوة الاولى على تحضين الجلسريد الثلاثى مع إنزيم ليباز البنكرياس للحصول على جلسريد أحادى (٢ -) كما يحدث فى نفس الوقت نزع مجموعة أسيل من الجلسريد الثلاثى ليعطى ١ ، ٢ - و ٢ ، ٣ - جلسريدات ثنائية .

٢ - بعد فصل الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ - و ١ ، ٣ - بواسطة TLC يحدث لها تفاعل فسفرة مع فينايل ثنائى كلورو فوسفات وذلك لانتاج مخلوط من ١ ، ٢ - ثنائى أسيل - ٣ فوسفاتيديل فينول و ٢ ، ٣ - ثنائى أسيل - ١ - فوسفاتيديل فينول .

٣ - تحضين المركبات المفسفرة مع إنزيم الفسفوليباز A فانه ينفرد الحامض الدهنى من الموضع (٢) فى حالة ما اذا كانت مجموعة الفوسفاتيد على الوضع (٣) ولا يحدث ذلك اذا كانت مجموعة الفوسفاتيد على الوضع (١) اى أن هذا الانزيم يحلل فقط الحامض الدهنى فى الوضع ٢ عندما تكون مجموعة الفوسفاتيد فى الوضع (٣) .

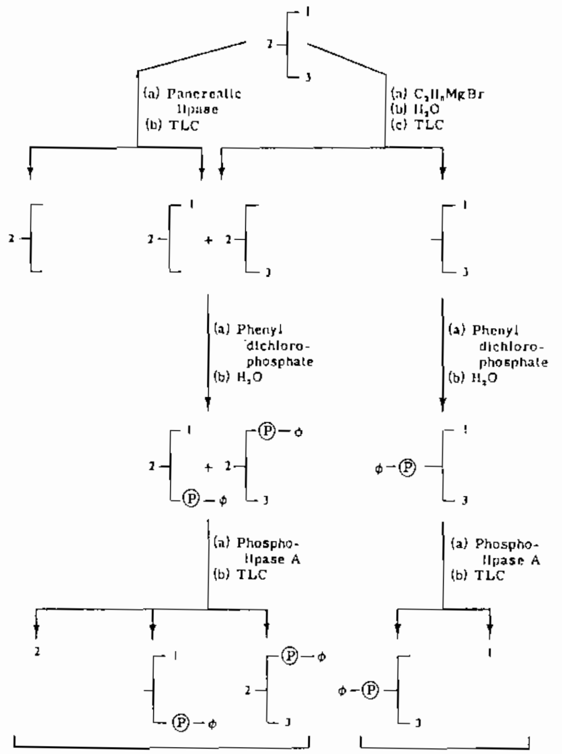
يتم فصل الاحماض الدهنية والتعرف على توزيعها فى المواضع ١ و ٢ و ٣ كما يلى :

١ - يتم التعرف على الحامض الذى يشغل الوضع (١) من خطوة التحليل المائى باستعمال انزيم الفوسفوليباز A .

٢ - يتم التعرف على الحامض الذى يشغل الموضع (٢) من التحليل المائى للجلسريد الاحادى بواسطة إنزيم الليباز .

٣ - يتم معرفة الحامض الذى يشغل الموضع (٣) بالفرق .

فى هذه الطريقة يتم تقدير الاحماض فى الوضع ١ و ٢ مباشرة والموضع ٣ بالفرق .



Sn - 1,2 (2,3-) Diglyceride method   Sn - 1,3 - Diglyceride method

ب - طريقة بروكرهوف للجلسريد الثنائى ١، ٣

sn-1,3 - Diglyceride Method of Brockerhoff (Brockerhoff et al, , 1966)

١ - يتفاعل مركب جرينيارد مع الجلسريد الثلاثى ليعطى جلسريدات ثنائية (١ . ٣)، (٢ . ٣) وكذلك ١ . ٣ ممثل للجلسريد الثلاثى .

٢ - يفصل الجلسريد الثنائى ١ . ٣ باستخدام TLC ثم يحول الى ١ . ٣ ثنائى الاسيل ٣- فوسفاتيديل فينول وذلك باستخدام فينايل ثنائى كلوروفوسفات .

٣ - التفاعل مع إنزيم الفوسفوليبياز A يفرد الحامض الدهنى فى الوضع (١) فقط ويعطى ليسوفوسفاتيد يحتوى على مجموعة أسيل فى الوضع (٣) أى أن هذا الانزيم مختص فى هذه الحالة على انفراد الاحماض الدهنية فى الوضع ١ .

٤ - بعد فصل وتحليل الاحماض الدهنية من التفاعلات المختلفة يمكن معرفة انواع الاحماض التى تشغل المواضع الثلاثة كلها مباشرة .

* يتم معرفة الحامض الذى يشغل الوضع ١ من خطوة التحليل بواسطة انزيم فسفوليباز A

* يتم معرفة الحامض الذى يشغل الوضع ٢ من الجلسريد الاحادى الناتج من خطوة التحليل بواسطة أنزيم الليباز .

* يتم معرفة الحامض الذى يشغل الموضع ٣ من الليسوفوسفاتيد الناتج بفعل انزيم فوسفوليباز A .

* ومن أهم عيوب هذه الطريقة هو أنه قد يحدث نتيجة لاستخدام مركب جرينارد تكوين مشابهات مما يقلل من كفاءة الطريقة .

* ومن مميزات هذه الطريقة هو تقدير الاحماض فى الوضع ٣ مباشرة وليس بطريقة الفرق كما فى الطريقة السابقة .

ج - طريقة لاندس Method of Lands (Lands et al. , 1966)

١ - الخطوة الاولى هى تحليل جزئى للجلسريد الثلاثى بواسطة إنزيم الليباز ثم يتبع ذلك فصل ٢ - جلسريد أحادى وكذلك الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ و ٢ ، ٣ - من نواتج التفاعل .

٢ - تحضين الجلسريدات الثنائية مع إنزيم Diglyceride kinase الذى يفسفر ١ . ٢ -

الجلسريد الثنائى فقط الى ١ ، ٢ - ثنائى أسيل ٣ - فوسفاتيد بينما يبقى الجلسريد الثنائى الآخر كما هو بدون فسفرة .

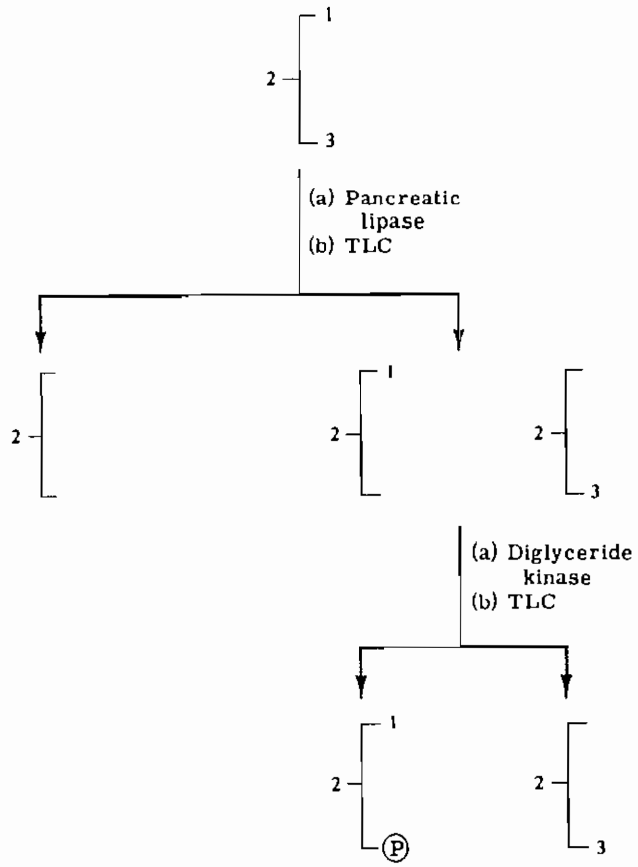
٣ - يمكن حساب ومعرفة المواضع ١ و ٢ و ٣ التى تشغلها الاحماض الدهنية على جزىء الجلسريد الثلاثى الاصلى كما يلى :

* يمكن معرفة المواضع ١ من : ١ ، ٢ - فوسفاتيد الجلسريد الاحادى .

* يمكن معرفة المواضع ٢ من : ٢ - جلسريد احادى الناتج من التحليل الانزيمى مباشرة باستخدام الليباز .

* يمكن معرفة المواضع ٣ من : ٣ (جلسريد ثلاثى اصلى - ١ ، ٢ فوسفاتيد).

1. METHODS



إختيار الطريقة Choice of method

بتوقف إختيار الطريقة المناسبة على :

١ - الدقة .　　٢ - السرعة .　　٣ - كمية الحامض الدهنى المراد تقديره .

١ - عندما تكون الدقة المتناهية هى المطلوبة فنختار طريقة (-2,3) - 1,2 الجلسريد الثنائى لبروكرهوف وذلك للاسباب التالية :

إن إنتاج الجلسريدات الثنائية من ١ .٢ - و ٢ .٣ - باستخدام مركب جرينيارد أو انزيم الليباز تعتبر أكثر تمثيلا للواقع عن طريقة ١ .٣- وذلك لان طريقة ١ .٣- تعطى مشابهات مما يزيد من الخطأ ويقلل من الدقة .

٢ - التقدير المباشر للاحماض الدهنية التى تشغل الوضع ١ وكذلك طريقة حساب الموضع ٣ تعطى بيانات أكثر دقة من طريقة لاندس التى تحسب الموضعين ١ و ٣ بالفرق .

٣ - عندما تكون السرعة هى المطلوبة تختار طريقة لاندس وذلك لانها أسرع طريقة وذلك لان طريقة بروكرهوف تشمل على الخطوات التالية :

أ - التحليل بواسطة إنزيم الليباز .

ب - الفسفرة .

ج - التحليل بانزيم فوسفوليباز A .

وكل هذه الخطوات تحتاج ٣ - ٤ يوم للتحليل التخصصى الفرغى وأن طريقة لاندس تحتاج الى ثلثى المدة السابقة حيث ليس من الضرورى إجراء خطوة التحليل بانزيم الفوسفوليباز A .

٤ - اذا كان من الضرورى تقدير الحامض الدهنى الذى يشغل الوضع ٣ فلا بد من إختيار طريقة تقدير الحامض الدهنى الذى يشغل الوضع ٣ فلا بد من إختيار طريقة ١ ,٣ - الجسريد الثنائى لبروكرهوف التى تقدره مباشرة وليس بالفرق .

فسفرة الجلسريدات الثنائية

Phosphorylation of diglycerides

أولا : بواسطة ثنائى كلوروفوسفات الفينايل

Phenyl dichlorophosphate

١ – يذاب ٩٣ مجم من الجلسريدات الثنائية فى اسم٣ من الاثير الجاف ثم يضاف بالتدريج Dropwise مع التحريك الى المخلوط اسم٣ من البيريدين الجاف – اسم٣ إثير – ٥ , ٠سم٣ من ثنائى كلوروفوسفات الفينيل حديث التقطير .

٢ – بعد ٦٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة يضاف ٥ سم٣ بيريدين و ٣سم٣ اثير ثم بضع نقط من الماء مع التبريد .

٣ – ينقل مخلوط التفاعل الى قمع فصل يحتوى على ٣٠ سم٣ كحول ميثايل و ٢٥سم٣ ماء و٣٠سم٣ كلوروفورم واسم٣ ثلاثى إيثايل أمين – وبعد الرج تؤخذ طبقه الكلوروفورم السفليه ويبخر المذيب للحصول على فوسفاتيديل الفينول .

ثانيا : فسفرة الجلسريدات الثنائية بواسطة إنزيم Diglyceride kinase

١ – يوضع ١ – ٣ مجم من الجلسريدات الثنائية ١ ، ٣ – (٢ ، ٣ –) فى أنبوبة إختبار ثم تضاف الجواهر الكشافة التالية : ١٠ ميكرولتر من ٢٠٠ مجم/ سم٣ مخلوط أملاح الصفراء Bile Salts –١ , ٠ سم٣ من ٠٫٠٥ مول أدينوزين ثلاثى فوسفات – ٠٫٠٥ سم٣ من امول كلوريد ماغنسيوم – ٠٫٠٥ من ٠٫٥ مول فوسفات الصوديوم كمحلول منظم (pH ٧,٩٥) – ٠,٨ مجم من إنزيم diglyceride Kinase الخام فى ٠,١ سم٣ من محلول منظم سستئين الفوسفات .

٢ – يحضن التفاعل على ٣٧°م مع التحريك المستمر وبعد ١ ساعة يضاف ٢,٠ سم٣ من اعيارى حامض الهيدروكلوريك .

٣ – تستخلص الليبيدات بواسطة ٢ سم٣ من مخلوط كلوروفورم : ميثانول (٢:١) يتبعه اضافة ١,٣ سم٣ كلوروفورم .

٤ – تضاف نقطة من ثلاثى إيثايل أمين الى المستخلص الكوروفورمى الكلى ثم يبخر المذيب .

٥ – تفصل sn-1,2-diacyl-3-phosphatidate بواسطة TLC باستخدام حامض السيليسيك كطور ثابت وكلوروفورم – ميثانول – ماء (٦٥ – ٢٦ – ٨) كطور متحرك.

تحليل الفوسفاتيديل فينول بواسطة إنزيم Phospholipase A

١ – تذاب الفوسفاتيديل فينول (٧ – ١٠ مجم) فى ٣ سم^3 اثير ثم يضاف ١ , ٠ سم^3 محلول منظم Tris يحتوى على كلوريد كالسيوم (٥ . ٠ مول Tris– ٠٠٢ , ٠ مول كلوريد كالسيوم ذو (pH ٧. ٥) ، ٠٥ , ٠ مجم من Ophiophagus hannah venom ثم يرج المخلوط لمدة ١٢ ساعة .

٢ – يضاف ٥ سم^3 أيزوبيوتانول – ٠٢ , ٠ سم^3 حامض خليك الى المخلوط السابق ثم يبخر نواتج التفاعل حتى الجفاف باستخدام Rotary evaporator .

٣ – يذاب المتبقى فى كمية قليلة من كلوروفورم – ميثانول (٢ : ١) ثم يضاف كشريط على لوح TLC يحتوى على حامض سيليسيك ثم تجرى له development باستخدام مذيب هكسان – اثير – حامض فورميك (٥٠ – ٥٠ – ١) .

٤ – يرش الثلث العلوى من اللوح بواسطة محلول 2,7- dichloro - fluorescein ثم تحدد مكان الحامض الدهنى المنفرد ويستخلص .

٥ – تجرى مرة أخرى عملية الـ development للوح باستخدام المذيب كلوروفورم – ميثانول – ١٤ مول إيدروكسيد الامونيوم (٩٠ – ٨ – ٣) حتى الثلث العلوى من اللوح .

٦ – يرش اللوح بواسطة محلول Rhodamine 6 G ثم تحدد أماكن الليسوفوسفاتيديل فينول والفوسفاتيديل فينول غير المحلله وتستخلص بواسطة مخلوط كلوروفورم – ميثانول (١:٢).

٧ – تحول نواتج التفاعل الثلاثة الى إسترات الميثايل لمعرفة أنواع الأحماض الدهنية بواسطة جهاز الكروماتوجرافى الغازى .

التطبيقات

Application

أ - توزيع مواضع الاحماض الدهنية

Positional distribution of fatty acids

تستخدم طرق التحليل التخصص الفراغى على نطاق كبير لمعرفة التوزيع الموضعى للاحماض الدهنية بين الموضع ١ ، والموضع ٢ ، الموضع ٣ للجلسريد الثلاثى فى الدهون الطبيعيه واجريت مقارنه بين طريقتى بروكرهوف – 1,3 و (2,3) - 1,2 على جلسريد ثلاثى لزيت الذرة فاوضح التحليل الفراغى المتخصص أن البيانات متقاربة جدا فى الطريقتين .

ب - تركيب مخاليط الجلسريدات الثلاثية

Composition of TG mixtures

تستخدم طرق التحليل الفراغى المتخصص لمعرفة الاحماض الدهنية المكونة لمخاليط بسيطة من الجلسريدات الثلاثية المفصولة من الدهون الطبيعية وتعتمد كفاءة هذه الطريقة على مدى تعقد متشابهات المخلوط فمثلا فى حالة الجلسريدات الثلاثية ثنائية الحامض لها ٣ متشابهات محتمله :

sn - PLL sn - LPL sn - LLP

وهذا التركيب الفراغى للمخلوط يكون من السهل مباشرة معرفته بطرق التحليل التخصص الفراغى .

وفى حالة الجلسريدات الثلاثية ثلاثية الحامض فان لها ستة متشابهات فمثلا :

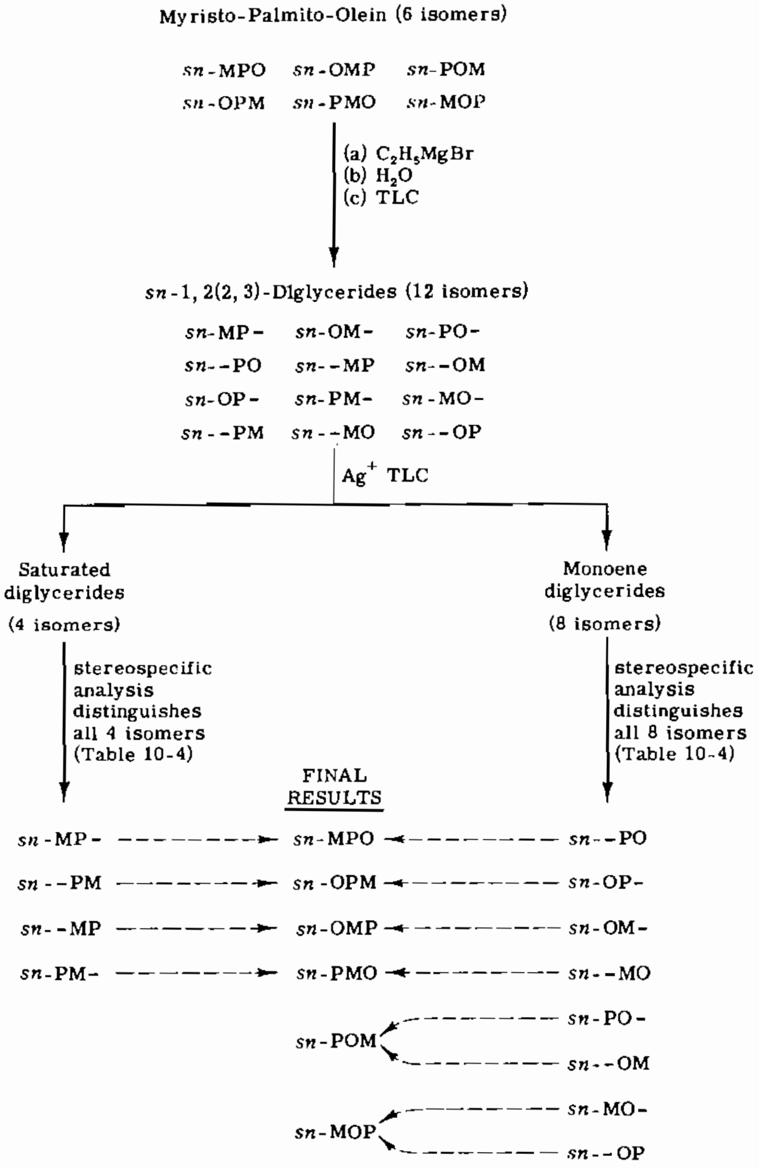
sn - MPO sn - OMP sn - POM

sn - OPM sn - PMO sn - MOP

وتوجد صعوبة فى فصل متشابهات هذا المخلوط بعملية واحدة single من التحليل الفراغى المتخصص وتنشأ هذه الصعوبة من المثال التالى اذا كان تركيز حامض الميرستيك هو ٣٠ ٪ فان معنى ذلك أن النسبة ٣٠٪ تتوزع على الجلسريدات الثلاثية Sn - MOP, Sn- MPO لكن النسبة بين هذين النوعين من متشابهات الجلسريدات الثلاثية غير معروفة ، وأيضا فى الجلسريد الثلاثى Sn - MPO الذى يحتوى فى الموضع ١ – على M والوضع ٢ على P

والموضع ٣ على O نجد أن P يشغل الموضع ٢ فى كلا من المتشابهات OPM و Sn-MPO فى إحتلال نفس الموضع ومرة أخرى فان النسبة بين كل هذه الازواج ما زالت غير معروفه وعادة تقدر واحدة فقط من أزواج تلك المشابهات .

ونظم التحليل العامة لتقدير الـ ٦ مشابهات من ميرستو بالميتوأولين Myristo Palmito Olein موضح بالشكل التالى :



وتشمل خطوات التحليل على النقاط التالية :

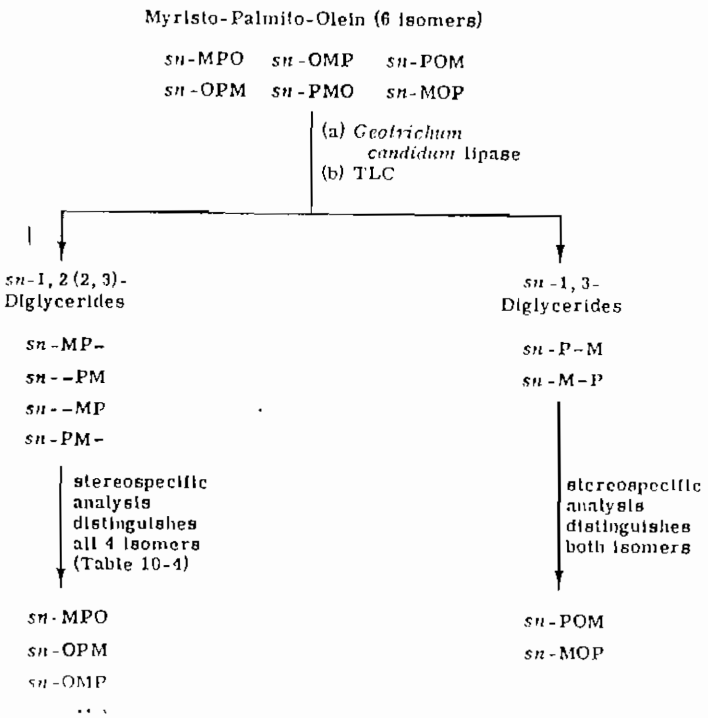
١ - ازالة مجموعة أسيل بواسطة الجوهر الكشاف جرينارد أو إنزيم ليباز البنكرياس .

٢ - فصل الجلسريدات الثنائية الناتجة عن طريق عدم التشبع باستخدام أيون الفضة المضاف الى حامض السيليسيك .

٣ - فصل أنواع الجلسريدات الثنائية بطريقة التحليل الفراغى التخصصى .

يتم نزع الاحماض الدهنية بواسطة مركب جرينيارد ليعطى ١٢ جلسريد ثنائى من نوع ١ ٢ - و ٢ . ٣ حيث تنفصل الى مركبات مشبعه ومركبات احادية عدم التشبع على الواح TLC المدعمة بالفضة ويتم التعرف على متشابهات الجلسريدات الثلاثية من معرفة تركيب الجلسريدات الثنائية معتمدا على نوع الحامض الدهنى الذى يشغل الموضع ٢ الذى يمكن اعتباره مشتركا مع جلسريد ثنائى آخر ولكن يختلف فى موضع الحامض الدهنى الذى يشغل الموضع ١ أو ٣.

والشكل التخطيطى التالى عبارة عن نموذج آخر للتعرف على توزيع الأحماض الدهنيه فى ميرستو بالميتو أوليين .



١ - يقوم انزيم الليباز المستخلص من Geotrichum candidum تخصصيا بازلة مجاميع الأوليل (cis -9) للجلسريدات الثلاثية .

٢ - الفصل الكروماتوجرافى للجسريدات الثنائية ١ ، ٢ - (٢ ، ٣) و ١ ، ٣ على الواح TLC باستخدام حامض سيليسيك كطور ثابت .

٣ - التحليل الفراغى التخصصي لفصل المكونات لنوعين من الجلسريدات الثنائية ١ ، ٢ (٢ ، ٣) - و ١ ، ٣ للتميز والتعرف على المتشابهات الست الأصلية للجلسريدات الثلاثية .

الفصل التاسع

الكروماتوجرافى الغازى

Gas - Iiquid chromatography

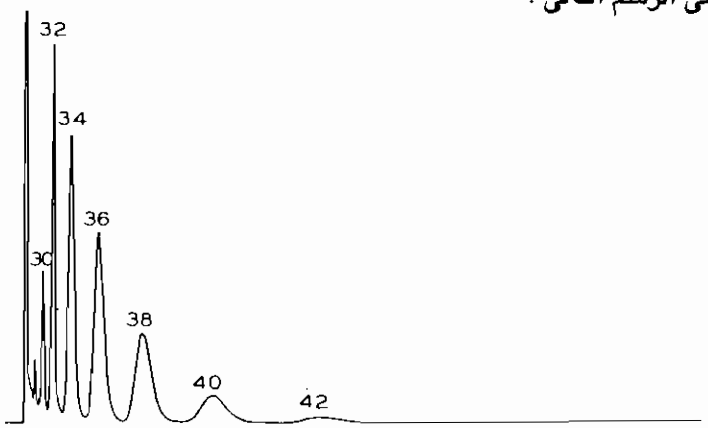
يعتبر الـ GLC بدون شك من أحسن الطرق التحليلية فى مجال كيمياء الليبيدات ويعتبر GLC طريقة فعالة لتقدير الأحماض الدهنية كميا فى مخاليطها وبالتالى فهى قادرة على اعطاء معلومات وافية من الاحماض الدهنية الغير المعروفة التركيب ويمثل GLC أحد أنواع التوزيع الكروماتوجرافى ولكن يختلف عن الأنواع الأخرى فى أن الطور المتحرك هو غاز والطور الساكن (الطور الثابت) يلتصق على مادة دعاميه خاملة كيماوية غالبا ما تكون من الـ Celite أو الطوب الحرارى ويعبأ فى أنبوبة قطرها ٣ - ٦ ملليمتر وطولها ١.٢ - ٦.٣ متر أو قد يغطى السطح الداخلى مباشرة لأنبوبة شعرية طولها ١٥ - ٦٠ متر تجرى عملية الفصل على درجة حرارة مرتفعة للمركبات ذات الوزن الجزىء العالى على العكس من المركبات ذات الوزن الجزئى المنخفض والغاز يمر خلال كاشف Detector الذى يقيس التغيرات فى الغاز .

يعتمد الفصل فى حالات التوزيع الكروماتوجرافى على الاختلافات فى معامل التوزيع للمركبات الموجودة فى المخلوط وهى تتأثر أيضا بمدى تطاير المكونات ومدى ذوبانها فى الطور الثابت وأيضا الوقت الذى يأخذه كل مكون أثناء مروره فى العمود .

وتفصل الاحماض الدهنية غالبا على صورة إسترات الميثايل باستخدام نوعين رئيسيين من الأطوار الثابته وهى القطبية Polar وغير القطبية Non - Polar وهى تختلف عن بعض بدرجة واضحة ويمكن إستخدام أطوار ثابتة مختلفة القطبيه وهى تعطى معلومات قليلة عن التركيب الكيماوى ولكنها مفيدة بدرجة ما لمعرفة تركيب الأحماض الدهنية - ويستخدم بكثرة الطور الثابت الغير القطبى Non - Polar مثل Apiezon greases أو تحضيرات Fluorinated Silicone و Non - Volatile hydrocarbons .

والأطوار القطبية Polar غالبا ما تكون عبارة عن إسترات عديدة مشتقة من كحولات ثنائية الأيدروكسيل dihydric مثل (ethylene glycol, diethylene glycol, propylene

(glycol glycol, 1,4 - butanediol وأحماض ثنائية القاعدة dibasic acids مثل (succinic, glutaric, adipic, suberic, Phthalic, iso - phthalic acids) والأطوار القطبية غالبا ما تكون أقل ثباتا حراريا من الطور الغير القطبى - عندما تجرى عمليات الفصل على درجة حرارة ثابتة isothermally تخرج المواد بسرعة من العمود على شكل شرائط وتظهر على المسجل على صورة Peaks وفى البداية يكون لـ peaks قمة حادة يتبعها Peaks ذات قمة مفلطحة كما فى الرسم التالى :



وبزيادة درجة الحرارة بصورة منتظمة temperature programming خلال عملية الفصل يمكن الحصول على Peaks تمتاز بدون إختلافات فى الشكل .

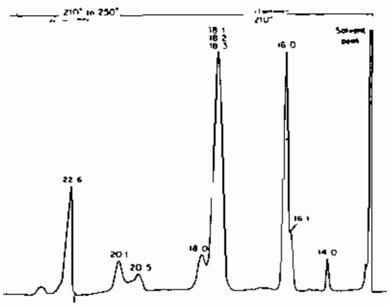
وعند جمع المركبات المفصولة من العمود خاصة اذا كان الـ detector من النوع الذى يتلف المركبات مثل Flame ionization detector فانه لا بد من وضع منظم أو مجزىء للغاز للتحكم فى الغاز الداخل أو المسموح به فقط الذى يدخل الـ detector وأمكن عن طريق الفصل الجيد بواسطة جهاز الـ GLC إثبات أن معظم الدهون الطبيعية تحتوى على عدة أنواع من الاحماض غير متوقعة وتحتوى أيضا على بعض التراكيب الغير متوقعة وعلى سبيل المثال يحتوى لبن الانسان على الأقل ٣٩ حامض دهنى ولبن البقرة يحتوى على الأقل ٨٥ حامضا دهنيا ويمكن فصل كل حامض فى المخلوط وخاصة اذا استخدمت طرق أخرى من الفصل بالأضافة الى GLC .

ويمكن أن يطبق هذا التكنيك فى حالات التقدير الكمى وهذا يأتى عن طريق قياس المساحة الموجودة تحت كل الـ Peaks عن طريق تحويل الـ Peak الى مثلث أو القطع ثم الوزن أو القياس عن طريق Planimeter أو باستعمال Integration recorder أو بواسطة recorder .

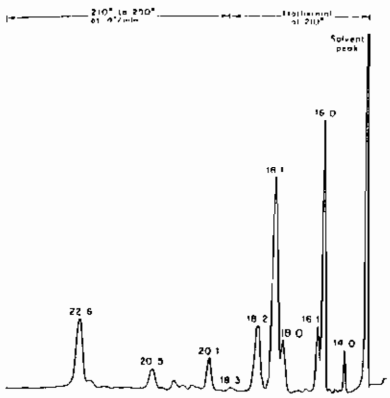
ويفصل جهاز الـ GLC الاحماض الدهنية على صورة إسترات الميثايل ولكن فى حالة الأحماض الدهنية الطيارة فانها تحول إلى مشتقات Butyl أو الـ phenyl esters (الأحماض أقل من ٣ - ٩ ذرة كربون) أى عن طريق تطويل السلسلة الذى يقلل من درجة تطايرها .

ويجب التنويه الى أن بعض الاسترات لم تخرج من العمود وأنه يلزم إجراء بعض التحويرات لخروجها من العمود والكشف عنها - ويلاحظ أنه يحدث للأحماض الدهنية غير المشبعة التى تحتوى على ثلاث روابط زوجية فى وضع متبادل Conjugated trienoic تغير فى الوضع الفراغى وإنتقال الروابط الزوجية الى موضع آخر .

ويحدث أيضا تحلل للاحماض التى تحتوى على حلقة ثلاثية غير مشبعة Cyclopropene acids والأحماض الأيدروكسيلية ثنائية الرابطة الزوجية hydroxy dienoic acid أى الأحماض التى تحتوى على نوعين من المجاميع الفعالة dimorphecolic إلا إذا أجرى التحكم فى درجة الحرارة بكفاءة عالية .



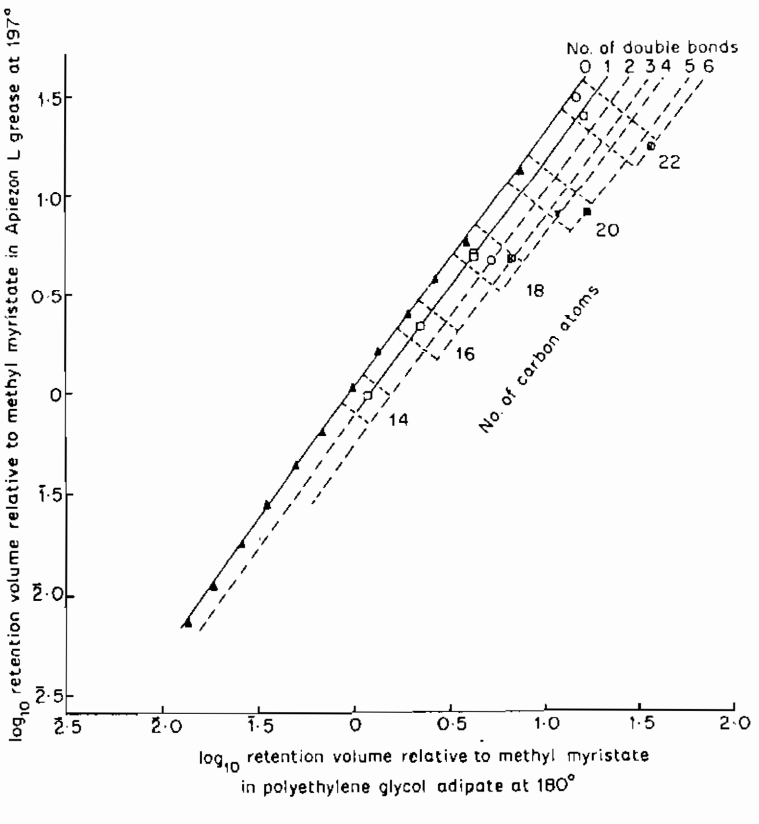
الفصل باستخدام عمود غير قطبى



الفصل باستخدام عمود قطبى

وللتعرف على الـ Peaks المتحصل عليها من مخاليط الاحماض الدهنية يجرى مقارنة للـ Retention Volume مع الاسترات القياسية Reference esters ويفضل على الأقل استعمال نوعين من الأعمدة ذات القطبية المختلفة وهذا يسمح بالتعرف على المركبات غير المعروفة ويعطى معلومات إعتبارية عن التركيبات الغير معروفة .

وعند توقيع لوغاريتم أرقام الظهور Retention times لسلسلة من المركبات المتجانسة ضد عدد ذرات كربون وتم الفصل على درجة حرارة ثابتة تعطى علاقة خط مستقيم ميله عبارة عن الظروف التى أجرى عندها الفصل مثل (درجة الحرارة - الطور الثابت .. الخ) وتعطى المركبات ذات السلاسل المتجانسة والقريبة فى تركيبها الكيماوى خطاً موازيا والأحماض الدهنية المشبعه Saturated - أحادية عدم التشبع Monoene - ثنائية عدم التشبع diene المتشابهات Iso كلها تعطى خطوطا متوازية إلا أن كل خط يعبر عن تركيبه من الأحماض الدهنية بعينها والتى تختلف فقط فى طول السلسلة كما فى الرسم التالى :



وتوجد بصفة عامة طريقتين للتعرف على الأحماض الدهنية من الـ Retention data وهما:

١ - المقارنة عن طريق وقت الظهور النسبى أى إيجاد الـ Retention time لخاليط الأحماض بالمقارنة بالـ Retention times للمواد القياسية المستعملة مثل methyl myristate و methyl palmitate .

٢ - الطريقة الثانية وهى أقل دقة ولكنها مفيدة وهى طريقة Equivalent Chain Length (E.C.L) أو تسمى بالرقم الكربونى Carbon number وهذه القيمة تعتمد على الطور الثابت ولا تعتمد بدرجة كبيرة على ظروف التجربة مثل درجة الحرارة ومعدل السريان وأبعاد العمود .

ويلاحظ أن رقم الكربون يكون رقما صحيحا للاسترات المشبعة وهو يساوى عدد ذرات الكربون فى الحامض . فمثلا يكون رقم الكربون ١٤ لميرستات الميثايل ، ١٨ لاستيارات الميثايل .. ورقم الكربون لا يكون رقما صحيحا للاحماض الدهنية الأخرى فهو ١٧.٧ لأوليات الميثايل باستخدام عمود Apiezon L والجدول (٢٣) يبين بعض القيم لاسترات الاحماض الدهنية باستخدام أعمدة قطبية وغير قطبية

جدول(٢٤)

أرقام الكربون لبعض إسترات الاحماض الدهنية الشائعة

Carbon numbers of some common esters

METHYL ESTER	NON - POLAR APLa	SE-30 b	EGAc	POLAR DEGSd	EGSe
16:0	16	16	16	16	16
18:0	18	18	18	18	18
20:0	20	20	20	20	20
22:0	22	22	22	22	22
18:0 iso	17.6	--	17.5	17.5	--
18:0 anteiso	17.7	--	17.7	17.7	--
16:1	15.7	--	16.4	16.5	16.6
18:1 (9c)	17.7	17.8	18.4	18.5	18.5
18:1 (9a)	17.7	--	--	20.4	20.5
20:1	19.7	--	20.4	20.4	20.4
22:1	21.7	--	22.4	22.3	22.3
18:2 (9c, 12c)	17.5	--	19	19.4	19.2
18:2 (9t, llt)	18.7	--	19.9	20.7	21
18:3 (6c, 9c, 12c)	17.4	--	--	19.9	19.8
18:3 (9c, 12c, 15c)	17.5	--	19.8	20.4	20.1
18:3 (9t, 11t, 13t)	19.7	--	--	22,8	--
12 - Hydroxystearate	19.7	20	--	--	26.3
12 - Hydroxyoleate	19.4	--	--	--	26.3
12 - Acetoxystearate	19.8	20.6	--	--	24.7
12 - Ketostearate	19.3	19.8	--	--	25.4
Azelate	11.7	--	16.4	--	--

وتدل الحروف a و b و c و d و e على : Apiezon L و Silicone elastomer و Ethylene glycol adipate و Diethylene glycol succinate و Ethylene glycol succinate على التوالى . تؤثر درجة حرارة الفصل والنسبة المئوية للطور الثابت فى العمود وكذلك مدة استعمال العمود تأثيرا بسيطا على أرقام الكربون .

وترجع الأهمية من إستخدام على الأقل نوعين من الأطوار المختلفة لفصل الاحماض الدهنية من الأمثلة التالية :

يمكن تمييز الـ anteiso - stearate, iso - stearate عن الـ Oleate باستخدام عمود قطبى Polar ولا يمكن ذلك باستخدام عمود غير قطبى Non - Polar .

وأيضا يمكن تمييز استرات الاحماض الغير مشبعة C_{18} مثل الـ Linoleate, oleate, Linolenate, isolinolenate على عمود قطبى Polar ولا يمكن ذلك باستخدام عمود غير قطبى non - Polar وقد يختلط الأمر للتمييز ما بين اللينولينات واسترات C18 الا اذا تم الفصل باستخدام عمود غير قطبى .

والاحماض الدهنية غير المشبعة العادية لها ارقام ثابته تدل على نهاية السلسلة الكربونية End carbon chain (ECC) فهى ٣ و ٦ و ٩ فمثلا الاحماض :

و (17 ,14 ,11 ,8) 20:4 له رقم ECC يساوى ٣ .

و (14 ,11 ,8) 20:3 له رقم ECC يساوى ٦ .

و (8,11) 20:2 له رقم ECC يساوى ٩ .

ويمتاز كل حامض من هذه الأحماض بأن أول رابطة زوجية تقع ما بين ذرات الكربون ٨ و ٩ من الطرف الكربوكسيلى وأن معامل الفصل النسبى لهذه الاسترات المقابل لـ ECC هو كما يلى :

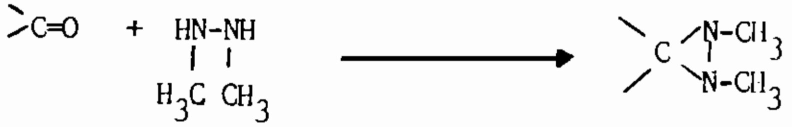
EEC	Separation factor معامل الفصل
٣ و ٦	١,٢٧
٦ و ٩	١,١٩
٣ و ٩	١,٥١

ويعبر عن معامل الفصل النسبى بأنه النسبه بين أوقات الظهور النسبيه Ratios of relative retention times وبغض النظر عن عدد ذرات الكربون وعدد الروابط الزوجية للأحماض الدهنية فانه يمكن إستخدام معامل الفصل للتنبأ بدرجة عدم التشبع ومواضع الروابط الزوجية لاسترات الميثايل للأحماض الدهنية - فمثلا عند قسمة وقت الظهور Retention time لحامض

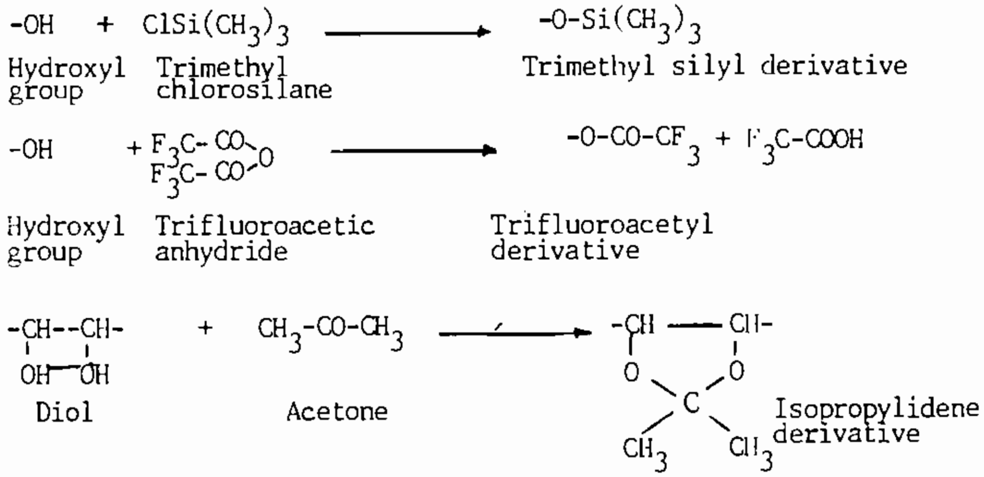
مجهول على وقت الظهور لحامض قياسى مثل (8,11,14) 20:3 الذى له ECC ١٩.١ وأن نتيجة القسمة ١.٢٧ فهذا يدل على أن الحامض المجهول لا بد وأن له رقم ECC يساوى ٣ .

ويمكن الحصول على معلومات مفيدة إضافية عن المكونات الغير معروفة التركيب والتعرف عليها بواسطة GLC وذلك بعد اجراء بعض التعديلات الكيماوية عليها فمثلا :

١ - تحول المركبات الكيتونية الى مشتقات N,N - dimethyl hydrazides أو تختزل المركبات الكيتونية الى مركبات إيدروكسيلية .



٢ - تؤكسد الاسترات الايدروكسيلية لتعطى إسترات كيتونية التى يجرى لها بعد ذلك عملية أستلة أو تحول الى مشتقاتها ثلاثى ميثايل السيلايل أو ثلاثى فلورو أسيتيل أو ايزوبروبيليدين .



٣ - تجرى عملية هدرجة للإسترات غير المشبعة أو تؤكسد إلى أحماض أحادية وثنائية القاعدية قصيرة السلسلة .

الطرق الطبيعية لتعيين التركيب الكيماوى لليبيدات

Non - Chromatographic Methods for chemical structure of lipids

أ - الطرق الضوئية (المرئية - فوق البنفسجية - والفلورة)

Ultraviolet, visible and fluorescence spectroscopy of lipids

تشمل الطرق الاسبكتروفوتومترية spectrophotometer على نوعين : امتصاص وفلوره . ولقياس المادة المختبره يجب إذابتها فى مذيب لا يمتص فى مدى الطول الموجى المطلوب القياس عليه . ويدل الاصطلاح لطيف الامتصاص absorption spectrum على نسب من الضوء الساقط والممتص عند كل طول موجى معين وعند تركيز معين . أما طيف الفلوره فهو ينتج من الجزيئات التى تمتص طاقة تبعث جزء منها بشعاع أطول من الطول الموجى الممتص ، وتعتمد خصائص طيف الامتصاص على الطول الموجى وكثافة الامتصاص ، تستخدم هذه المقاييس فى التحليل الطيفى الكمى والوصفى لتحديد نوع وتركيز الجزيئات الموجودة .

تعريفات Definitions

طول الموجه Wavelength

هى المسافة بين إرتفاعين أو إنخفاضين متتاليين لموجة الاشعاع وتحدد بالنانومتر (nm, 10^{-9} m) وتميز العين البشرية فقط نطاق ضيق من الطيف يقع ما بين ٤٠٠ - ٨٠٠ نانومتر .

النفاذيه Transmittance (T) .

هى النسبه ما بين الضوء النافذ (I) من محلول ما الى الضوء الساقط (Io) على المحلول . $T = I / I_0$

النسبة المئوية للنفاذية (%T)

هى حاصل ضرب النفاذية فى ١٠٠ .

الامتصاص Absorbance (A)

$A = \log_{10} 1/T$ $A = \log I_0 / I$

قانون Beer - lambert

يبين العلاقة ما بين الامتصاص والتركيز وطول الخليه Path length الذى يوضع فيه محلول العينه $A = a\ b\ c$

حيث أن Absorpitivity = a وهى ثابت وخاص للمركبات (معامل الامتصاص) ولا يعتمد على التغير فى التركيز .

، b = طول الخليه (سم)

، c = التركيز (جرامات / لتر) .

معامل الامتصاص الجزئى Molar absorpitivity

$E = A / bc$ $K = A / bc$

ويكون ـ ـكيز c = مولات / لتر

الكروموفور Chromophore

هى ذرة أو مجموعة من الذرات فى جزىء ما مسئوله عن الامتصاص الضوئى فى منطقة أو تحدث لون .

الأكسوكروم Auxochrome

هى ذرة أو مجموعة من الذرات تزيد كلا من طول الموجه وكثافة الامتصاص للكروموفور عندما تتصل مباشرة مع الكروموفور وهى لا تمتص الضوء .

Bathochromic effect

هى انتقال الامتصاص من طول موجه قصيرة الى طويلة .

Hypsochromic effect

هى إنتقال الامتصاص من طول موجه طويله الى قصيره .

Hyperchromic effect

يمثل زيادة فى الامتصاص عند طول موجى معين .

الانتقالات الالكترونية ومصدر الامتصاص الضوئى :

تؤثر أشعة .U.V والمرئية على المدارات الخارجية لاكترونات المشتركة فى الروابط الجزئية، ويعتمد الطول الموجى وكثافة الامتصاص على الانتقالات الالكترونية المختلفة فى أنواع الروابط الكيميائية للجزىء – والاشعة ذات طاقة عاليه لها طول موجى من ١٢٠ - ١٤٠ nm وهى مطلوبه لتهيج الكترونات فى الروابط الفردية C - C للهيدروكربونات المشبعة وتعتمد شدة الامتصاص على الانتقال من $\delta \rightarrow \delta^*$ تنتقل الكترونات π فى ذرة الكربون المرتبط بروابط زوجيه وثلاثية من $\pi \rightarrow \pi^*$ وينتج إمتصاص قوى يعرف باسم E-band ويحدث هذا الانتقال على طول موجى أطول من انتقال $\sigma \rightarrow \sigma^*$ لان الكترونات π اقل فى قوة الرابطة وتحتاج لطاقة أقل للانتقال وتمتص المركبات عديدة الروابط الزوجية المفصولة بمجموعة ميثيلين (-CH2-) واحده على الأقل على نفس الطول الموجى للرابطة الزوجية الواحدة ولكن تزداد شدة الامتصاص تقريبا تبعا لعدد الروابط الزوجية، وفى حالة وجود الروابط الزوجية فى الوضع التبادل conjugated تخفض الطاقة المطلوبة لانتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ معطيا K. band بزيادة الطول الموجى الذى يحدث عنده الامتصاص K.band بزيادة التبادل conjugation وانه بزيادة التبادل يزداد الامتصاص وتتغير قيم الامتصاص بحيث تحدث زيادة إضافية Additive values باضافة روابط زوجيه وهذا يؤدى الى رفع معامل الامتصاص الجزىء (اكثر من ١٠٠.٠٠٠) .

وفى حالة الكترونات n الغير مرتبطه للذره الغير متجانسه مثل الاكسوجين مجاورة لمجموعة تحتوى على الكترونات π مثل $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH$ و C=O فانه يحدث انتقال من نوع $n \rightarrow \pi^*$ معطيا إمتصاص ضعيف جدا R. band على طول موجى اعلى من ٢٠٠ nm بالاضافة الى وجود إمتصاص عالى يرجع إلى الانتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ وتعطى المجاميع الاكسوكرومية المحتوية على ذرات مثل الاكسوجين – النتروجين – الكبريت أو هالوجين إمتصاص ضعيف نتيجة للانتقال $n \rightarrow \pi^*$ ويحدث عادة على طول موجى قصير وعندما تكون هذه الذرات مثل OH متبادله مع مجموعة تحتوى على الكترونات π فانه يحدث امتصاص عال نتيجة للانتقال $n \rightarrow \pi^*$ عادة على طول موجى طويل .

وبمعرفة موضع وكثافة الامتصاص فيمكن إستنتاج نوع الانتقال الالكترونى الحادث وبالتالى طبيعة التركيبات الجزيئية الموجودة فمثلا :

يرجع عادة الامتصاص القوى اعلى من ٢٠٠ nm الى انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ للمجاميع المتبادله ويرجع الامتصاص المولى الضعيف اقل من ١٠.٠٠٠ الى الانتقالات $n \rightarrow \sigma^*$ ، $n \rightarrow \pi^*$.

تظهر البيانات فى الجداول ٢٥ ، ٢٦ معاملات الامتصاص الجزيئية للبيدات ويلاحظ زيادة الطول الموجى لأعلى الامتصاص بزيادة عدد الروابط الزوجية المتبادلة .

جدول رقم (٢٥)

قيم الامتصاص للكروموفورات الغير المتبادلة

Group	λ_{max} (nm)	ε_{max}	Reference
Saturated hydrocarbon			
$-(CH_2)_n-$	122–135	Intense	
Monoenes			
$-CH{=}CH-$			
Cis	183–184	12,850–13,800	4, 5, 6
Trans	186–189	11,200–11,900	
In steroids	200–210	1,000–4,500	7
1,4-Polyenes			
$-(CH{=}CH-CH_2)_n-$			
$n = 2$ cis	190	18,750	4, 5, 6
$n = 2$ trans	192	16,050	
$n = 3$ cis	192	25,150	
$n = 4$ cis	193	31,800	
$n = 5$ cis	193	37,400	
$n = 6$ cis	194	43,600	
Isolated diene			
$-CH{=}CH-(CH_2)_n-CH{=}CH-$			
$n > 1$	184	25,000–28,000	4
Alkyne			
$-C{\equiv}C-$	180–196 223–225	2,000–9,500 160–500	
Hydroxyl			
$>CH-OH$	180–185	150–500	8
Ketone			
$>C{=}O$	265–285 189–200	30 900–2,000	8, 9
Aldehyde			
$-C(=O)H$	280–300 190	15 50	9
Carboxyl			
$-COOH$			
Saturated chains, C_1–C_{14},	204–212	60	5, 6, 7, 9
Methyl esters	±2 of the acid	...	

جدول رقم (٢٦)

قيم الامتصاص للكروموفورات المتبادلة

Group	λ_{max} (nm)	ϵ_{max}	Reference
1,3-Polyenes			
—(CH=CH)$_n$—			
Dienes, $n = 2$			
Trans, trans	231	33,000–35,000	
Cis, trans	232–235	24,600–28,700	7, 10, 11
Trienes, $n = 3$			
Trans, trans, trans	259	47,000	7, 10, 12
	268	61,000	
	279	49,000	
Cis, cis, cis	262	36,200	
Trans, trans, cis	271	47,000–48,000	
	281–283	37,000–38,000	
Cis, cis, trans	265	. . .	
	275	47,800	
	387	. . .	
Tetraenes, $n = 4$			
All trans	288	56,400	7, 10
	301	87,100	
	315	77,900	
Cis and trans	292	50,000–53,000	
	305–306	76,000–78,000	
	319–321	66,000–69,200	
Pentaene, $n = 5$	315	. . .	7, 10, 13
	328	. . .	
	346	. . .	
Hexaene, $n = 6$	333	. . .	7, 10, 13
	353	. . .	
	374	. . .	
Octaene, $n = 8$	396	157,000	
Nonaene, $n = 9$	469	160,000	
1,3-Poly-ynes			
—(C≡C)$_n$—			
Di-yne, $n = 2$	227	370	7, 10
	238	344	
	253	120	
Poly-ynes, $n = 3$–6	200–280	130,000–450,000	14
	300–390	100,000–200,000	
trans-Ene-ynes	229	16,200	7, 10, 15, 16
trans-Ene-diyne	216, 240, 255	. . .	16
	269	24,000	
	284	. . .	
Monoene-one	231–263	6,000–18,000	7
	300–312	100–120	
Diene-one	277–314	7,600–26,300	7
Monoene-dione	252–270	5,000–11,400	7
2-Enoic acid	210–215	13,200	5, 7, 10
2,4-Dienoic acid	260	25,800	7, 10

الطرق Methods

تستخدم خلايا Cells أو Cuvettes عادة لمحلول الامتصاص لها قطر ١ سم٣ وذات غطاء لمنع تبخر المذيب ويتطلب حوالى ٣ سم٣ المحلول ، تصنع عادة الخلايا من الكوارتز لتقدير الامتصاص فى منطقة الاشعة .U.V اما الخلايا المصنوعة من الزجاج يمكن إستخدامها عند تقدير الامتصاص فى منطقة الطيفى المرئى .

يجب الا تمتص المذيبات فى نفس الحدود الطيفية للبيدات ولذلك يتطلب عادة مذيبات عالية النقاوة . ويوجد أنواع من المذيبات للتحليل الطيفى مخصوصة تجاريا وتستخدم المذيبات التالية هيدروكربونات مشبعة مثل هكسان ، هيبتان heptane ، أيزو أوكتان Isooctane سيكلوهكسان ، كحولات ، إيثيرات ، أسيتونتريل ، ٤.١ داى اكسان عند تقدير الامتصاص على طول موجى أقل من ٢٢٠ nm.

ويلاحظ أن إختلاف قطبيه المذيبات يؤثر على شدة الامتصاص ولذلك يجب ذكر إسم المذيب المستخدم عند تقدير الامتصاص وعموما المذيبات غير القطبية مثل الهيدروكربونات لها تداخل قليل جدا مع المواد المذابه وتسبب أقل تغير فى التركيب الدقيق فى التقدير الطيفى عند المقارنة بالمذيبات القطبية مثل الكحولات .

والجدير بالذكر ان الاكسجين فى الهواء يتداخل فى التحليل الضوئى الطيفى عند طول موجى اقل من ١٩٥ nm ولذلك توجد بعض الاجهزة يكون جوها غنى بالنتروجين ليحدث إمتصاص عند طول موجى ١٨٠ nm وللحصول على امتصاص للطيف على طول موجى اقصر يجب تزرويد الجهاز بمضخة تفريغ لازالة الهواء .

التطبيقات Applications

أمكن التعرف على الاحماض الثلاثية المتبادلة conjugated triene فى النباتات خلال امتصاصهم الطيفى القوى ، كذلك الاحماض المحتوية على مجاميع أسيتلينية acetylenic وبعض الاحيان متبادلة مع روابط ايثيلينيه .

أجريت دراسة الامتصاص الطيفى على متشابهات الاحماض trans, cis المحتوية على روابط زوجيه وثلاثيه عديده متبادله poly - yne, polyene ويوجد العديد من الأبحاث التى تبين الاطوال الموجيه التى يحدث عندها أقصى امتصاص U.V. maxima بالاضافة الى معامل الامتصاص المولى له .

تحدث الاكسدة الذاتية لليبيدات التى بها روابط زوجية عديدة polyene غير متبادله تغير فى النظام غير المشبع حيث يتحول إلى النظام المتبادل وبالتالى تعطى الليبيدات المؤكسدة امتصاص على طول موجى 230 nm .

يمكن تحديد كميات الدهون فى مخاليط بواسطة قياس الامتصاص المولى للمجاميع الكروموفورية chromophoric مثل المدونة فى الجداول (٢٥ ، ٢٦) وعادة تكون حساسية التقدير عالية عندما تختار المجموعات الكروموفوريه التى تمتاز بمعامل امتصاص كبير وبقياس التركيزات المنخفضة جدا (أقل من مللجم / سم٣) يدل على أنه توجد علاقه طردية ما بين التركيز والامتصاص .

ويرجع الانحراف عن الداله الخطيه الى عوامل تختص بالأجهزة ، مثل تشتت الضوء فى النظام الضوئى ، تغيرات فى التركيبات الجزيئية عند تركيزات مختلفة ، وأحيانا انبعاث فلورة بجانب الامتصاص .

عموما للدقة العالية يجب عند إستخدام الأجهزة تخفيف المحاليل لاعطاء قيم إمتصاص بين ٢ر – ٨ر ، والتحكم فى الظروف الاخرى مثل إجراء control وتحديد الطول الموجى الذى يعطى أقصى إمتصاص .

تم تقدير الاحماض الطبيعية غير المشبعه المتبادله ذات الروابط الزوجية polyene والروابط الزوجية والثلاثية polyene - yne معا بالتحليل الطيفى وكذلك تم تقدير المركبات الحيوية الهامة التى تحتوى على روابط زوجيه عديده فى الوضع المتبادل Polyene مثل الكاروتينات ، والكاروتيدات ، فيتامين A والمركبات المشابهه إستخدم أيضا التحليل الطيفى الضوئى لتحليل بعض المواد المتفاعلة والناتجة من التخليق الانزيمى للاحماض الدهنية ، فمثلا قدر نشاط الانزيمات المسئولة عن نزع الماء من B-hydroxy decanoyl-NAC الى B-decenoly-NAC بتقدير الامتصاص عند موجى ٢٦٣ .

يمكن تقدير المجاميع الكروموفورية الناتجة عن إعادة الترتيب الداخلى (تحويرات داخل الجزىء) أو بالتفاعل مع مواد محتوية على مجاميع لها قدره على إمتصاص الضوء – فمثلا عند تسخين المركبات التى تحتوى على ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ ، ٦ روابط زوجية فى وجود قلوى تنتج مركبات غير مشبعه متبادلة لها امتصاص قوى وأيضا قدر نشاط انزيم Lipoxygenase الذى يحول النظام غير المشبع Cis, cis- 1,4 diene الى cis, trans-1,3-diene hydroperoxides الناتج من حامض اللينوليك بقياس الامتصاص عند طول موجى ٥ ، ٢٣٢ .

يعتمد تقدير مجاميع الاستر فى الليبيدات على تفاعلها مع محلول قلوى من مادة هيدروكسيل أمين ليعطى حامض Hydroxamic وهذه الأحماض تكون معقدات ملونه مع ايونات الحديديك التى تمتص عند طول موجى ٥٣٠ .

Ester hydroxyl amine hydroxamic acid

تتفاعل الكاروتينات - ڤيتامين A والمركبات المتشابهة مع ثلاثى كلوريد الانتيمون ، 1,3 dichloro-2- propanol لتكوين معقدات ذات لون أزرق بنفسجى والذى يقدر لونيا بواسطة جهاز الاسبكتروفوتومتر - ويقدر ڤيتامين D بعد التفاعل مع ثلاثى كلوريد الانتيمون والتوكوفيرول بعد التفاعل مع كلوريد الحديديك - وتقدير الاستيرولات فى المنطقة المرئية من الضوء بعد التفاعل مع جواهر كشافه تحتوى على حامض معدنى قوى وحامض خليك - كما يقدر الاسكوالين بعد التفاعل مع حامض الكبريتيك والفورمالدهيد .

الفلوره Fluorescence

يعتبر طيف الفلورة طريقة ذات حساسية عاليه فى الكشف عن المركبات وبالرغم من انها غير شائعة لليبيدات فانه يمكن تطويرها بواسطة تفاعلات كيميائية مناسبة فمثلا يستخدم التفاعل بين الفوسفوليبيدات و Rhodamine 6G فى المحلول كطريقة فلورة دقيقة لتحليل مستخلصات الانسجة . بعض الاستيرودات مثل esterogens يحدث لها فلوره فى مدى U.V. بعد الاثارة باطوال موجيه قصيرة - وعند معاملة معظم الاستيرولات بحامض كبريتيك تعطى نواتج لها فلوره عاليه فى المدى المرئى وبالتالى يمكن تحليلها بواسطة التحليل الطيفى الضوئى.

وأيضا عند معاملة البروستجلاندينات Prostaglandins بحامض الكبريتيك يمكن تقديرها بواسطة الفللورة باستخدام كميات صغيرة تصل الى ٥ر مللجم .

$$R_1OCO\,R_2 + NH_2OH \longrightarrow R_1CONHOH + R_2OH$$

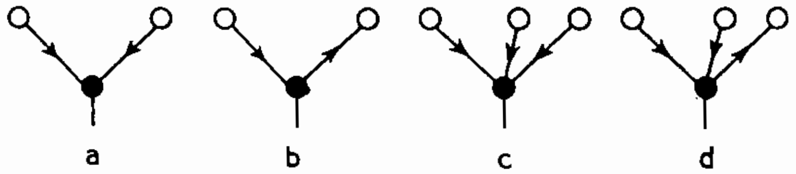
Ester hydroxyl amine hydroxamic acid

تحليل الليبيدات باستخدام الاشعة تحت الحمراء

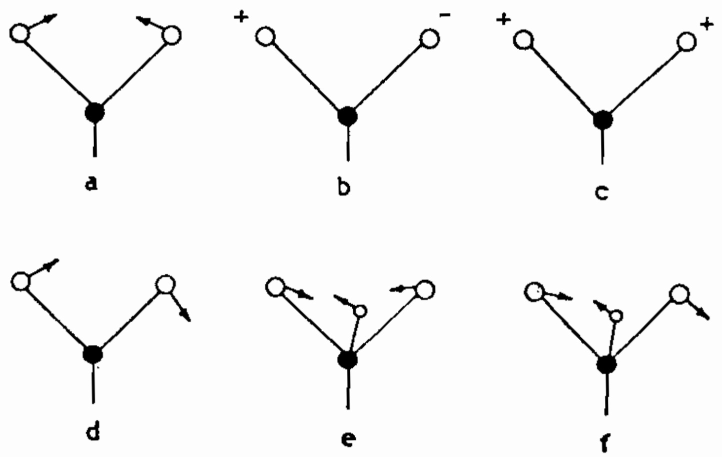
تبدأ المنطقة تحت الحمراء من نهاية اللون الاحمر فى الطيف المرئى عند طول موجى ٠,٠٨ ميكرون (١٢,٥٠٠ سم) وتمتد تقريبا الى منطقة الاشعاع القصير ٤٠٠ ميكرون (٢٥سم) ولقد بين العالم Planck أن طاقة الاشعاع تحت الحمراء أقل من الاشعة فوق البنفسجية أو المرئية ، وعلى هذا فهى غير قادرة على إثارة التركيب الالكترونى للجزيئات ولكن تؤثر فقط على طاقة الاهتزاز والدوران vibrational and rotational energy .

وتنقسم الاهتزازات المصاحبة للروابط التساهمية بين الذرات الى :

أ - إهتزازات Stretching على طول الروابط .



ب - إهتزازات إلتوائية Bending عمودياً على الروابط .



والجدول (٢٧) يبين نوعية الاهتزازات لمجموعة CH فى البروبان واقصى امتصاص يحدث عنده هذه الاهتزازات .

جدول(٢٧)

	Frequency (cm-1)
Asymmetric stretching	2928
Symmetric stretching	2853
Scissoring	1460
Wagging	1336
Twisting	1276
Rocking	748

وتحدث كل هذه الانواع من الامتصاصات بشدة لليبيدات وذلك لاحتوائها على سلاسل هيدروكربونية طويلة وحيث أن كل زوج أو مجموعة صغيرة من الذرات فى الجزئى تعطى سلسله من الامتصاصات Absorption bands فان الامتصاص فى منطقة الاشعة تحت الحمراء يعطى الكثير من المعلومات عن التركيب الجزئى على عكس من الامتصاصات فى مناطق المرئيه وفوق البنفسجية .

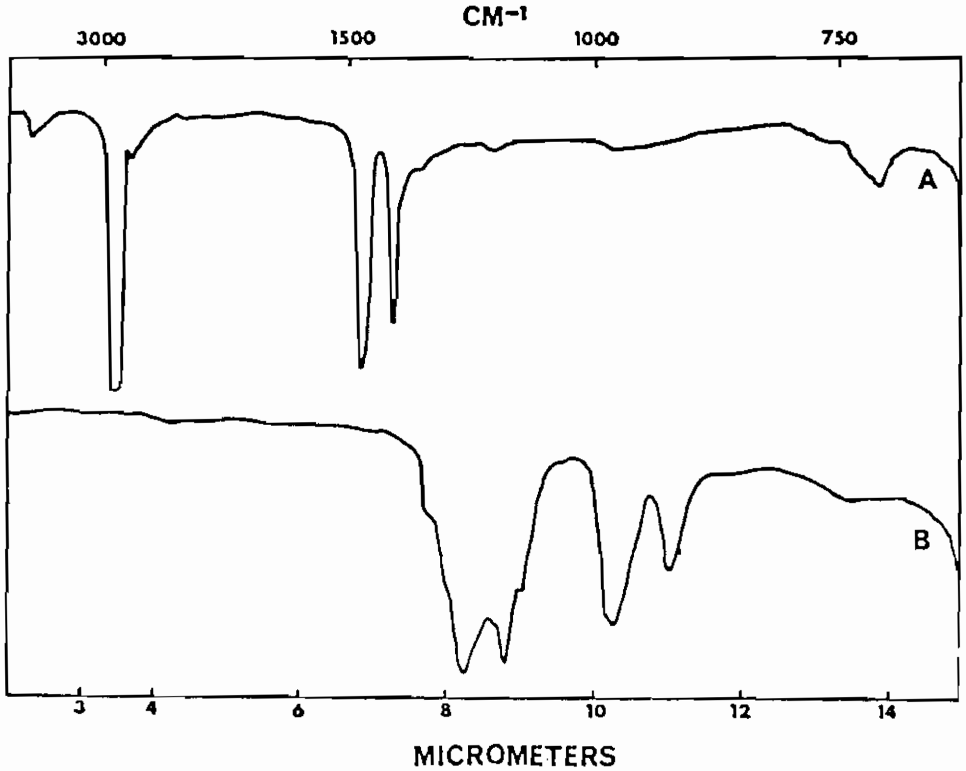
ومن الملاحظ أنه لا تظهر إمتصاصات فى منطقة الاشعة تحت الحمراء إذا كانت هذه الاشعة لا تحدث لها تغير فى الـ Dipole moment للرابطة - فمثلا طيف الامتصاص لـ CO_2 يعطى امتصاص واحد وهو من نوع Asymmetric stretching ولا يعطى إمتصاص من نوع Symmetric stretching .

علاوة على ذلك فأن قوة الامتصاص تعتمد على معدل التغيرات فى إزدواج القطب . ففى الليبيدات حيث يؤدى الامتصاص فى منطقة الأشعة تحت الحمراء لوجود الروابط الزوجية لمجاميع P=O, C=O أقوى من الروابط الفردية C-H ونتيجة الامتصاص لمجموعة كربونيل واحدة فانها تعطى إمتصاص غالبا ما تكون قوته تعادل إمتصاص ١٧ مجموعة ميثيلين .

تحضير العينات : Sample preparation

تفحص الليبيدات على صورة أفلام – سوائل – أو مختلطة مع هاليد الكيل ، فاذا كانت الليبيدات سائله على درجة حرارة الغرفة فان ابسط طريقة هو عمل فيلم مضغوط بين لوحين من كلوريد الصوديوم .

واذا كان الليبيد صلب فيمكن عمل عجينه Mull مع زيت البرافين Nujol مكونا فيلم وفى حالة إستخدام زيت البرافين (A) فانه لا يظهر مناطق امتصاص الهيدروكربون على أطوال موجيه ٢٧٥٠ – ٣٠٠٠ سم-١ ، ١٣٠٠ – ١٥٠٠سم-١ وبالتالى لا يمكن تمييز هيدروكربون الليبيدات وللتغلب على هذه المشكلة يستخدم فلوروكربون Fluorocarbon (B) للقياسات فوق 1300 cm^{-1} كما هو مبين فى الرسم التالى .



The infrared spectra of Nujol (a hydrocarbon, *A*) and Fluorolube (a fluorocarbon, *B*), both used for mulls.

وللحصول على Disc مناسب يجرى عمل Pellet من العينة وذلك باضافة بروميد بوتاسيوم أو كلوريد صوديوم أو كلوريد بوتاسيوم وهذه المواد شفافه ولا تمتص الاشعة فى المنطقة الاشعة تحت الحمراء وتوجد صعوبه فى عمل الـ disc متجانس ورائق مع الليبيدات عند خلطها بالاملاح التى تذوب فى الماء (كلوريد بوتاسيوم) ولذلك يجرى إضافة محلول الليبيدات الى الملح المعدنى وعند تبخير المذيب يترك disc متجانس .

ويتم عمليا إجراء spectrum للزيوت السائله أو الدهون أو الليبيدات الصلبه كما يلى :

١ - فى حالة الزيوت :

توضع نقطة بين قرصين مسطحين من كلوريد الصوديوم مع استعمال الضغط الخفيف .

٢ - الزيوت والدهون فى صورة محلول .

تذاب الماده الليبيديه لتعطى ١ - ٥٪ محلول من رابع كلوريد الكربون ويوضع هذا المحلول فى خلية خاصة سمكها ١و الى ٠١. و مصنوعه من كلوريد الصوديوم وتوضع خليه أخرى لها نفس السمك ولكن تحتوى على المذيب النقى فقط فى الناحية الأخرى من مجموعه الاشعة تحت الحمراء للجهاز لإلغاء تأثير الامتصاص بالمذيب ويجرى عادة الامتصاص الطيفى باستعمال محاليل مخففة فى مذيبات غير قطبية حيث انها تقلل بدرجة كبيرة تأثير القوى التى تربط الجزئيات مع بعضها .

٣ - المواد الليبيدية الصلبة :

توجد طريقتان لتجهيز المواد الليبيدية الصلبة وهما :

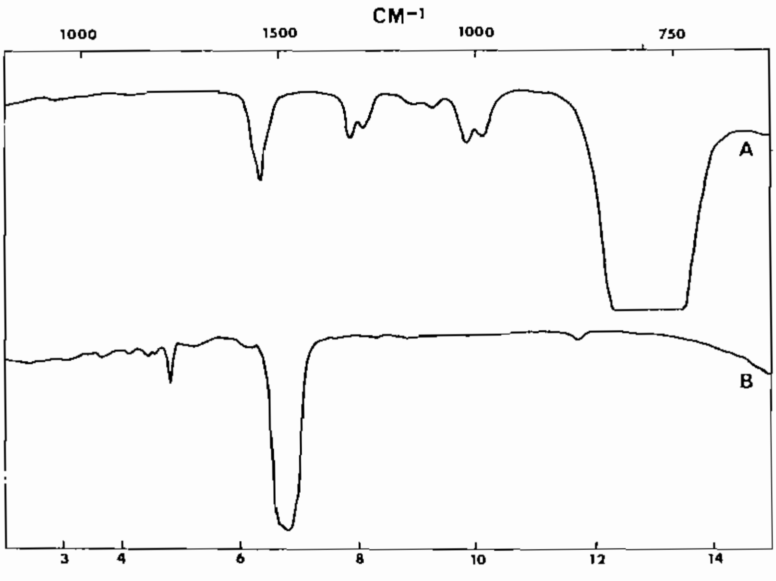
أ - Mull method

يوضع ٢ - ٥ مجم مادة ليبيديه صلبه ذات جزئيات دقيقة فى هون صغير مع ٤ - ٥ نقط من محلول هيدروكربون وتضغط هذه العجينة mull بين قرصين مسطحين من كلوريد الصوديوم ويعمل الزيت المعدنى على منع تشتت Scattering الضوء بدرجة كبيرة .

ب - تطحن المادة الليبيدية الصلبة مع ١٠ : ١٠٠ مرة وزنها بروميد البوتاسيوم النقى الجاف وتحول المخلوط الى صوره قرص باستعمال قالب mould مخصوص باستعمال الضغط وأن إستعمال بروميد البوتاسيوم يلغى المشاكل التى تنتج من إستخدام mulling agent وأيضا تميل إلى اعطاء إمتصاص طيف افضل .

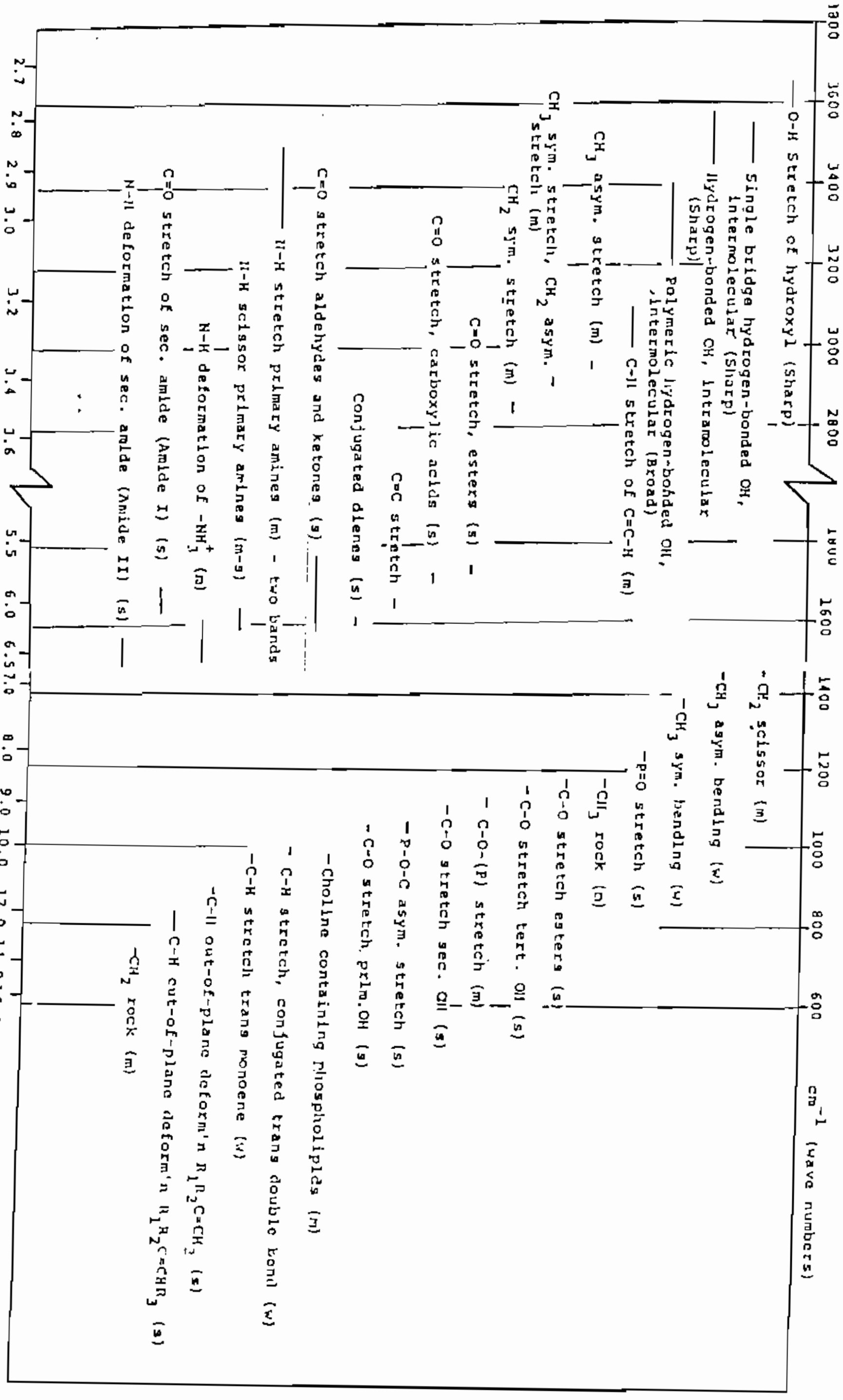
اختبار شفافية الدهن :

عند عمل عجينه أو disc تظهر إمتصاصات ترجع إلى الصور البللوريه للبيبدات ولا ترتبط بالتركيب الكيماوى لها نظرا للتركيب البللورى والتغلب على هذه المشكلة يجب ان تذاب العينه فى مذيب مناسب وعادة تستخدم مذيبات مثل رابع كلوريد الكربون وكبريتيد الكربون حيث أن هذه المذيبات شفافه ولا تمتص فى منطقة الوسط من الاشعة تحت الحمراء كما فى الرسم التالى .



The IR spectra of carbon tetrachloride (*A*) and carbon disulfide (*B*). With the right choice of either of these solvents measurements can be made in the entire rock-salt region.

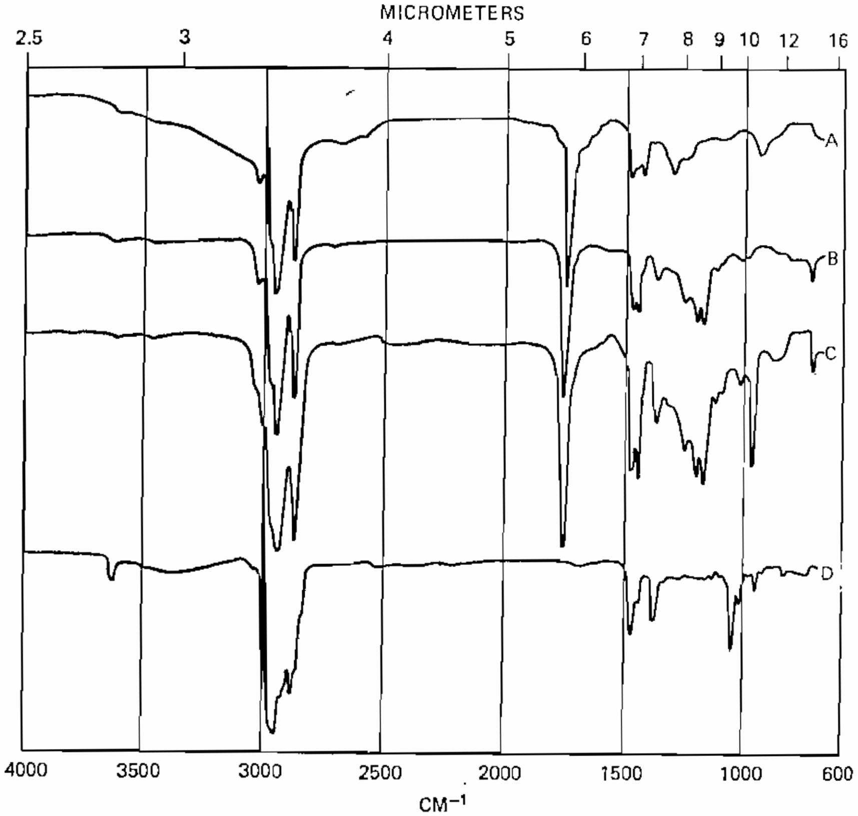
ويعتبر تركيز ٣ - ٥٪ يكون مناسبا وتوضع نقطة من هذا المحلول بين لوحين من كلوريد الصوديوم بينهما فاصل Spacer وبالتالى يمر بالضوء فى خلية ذات سمك ثابت .



A chart showing the positions of the various absorption bands most commonly encountered in lipids (intensities: s, strong; m, moderate; w, weak), with their structural assignments.

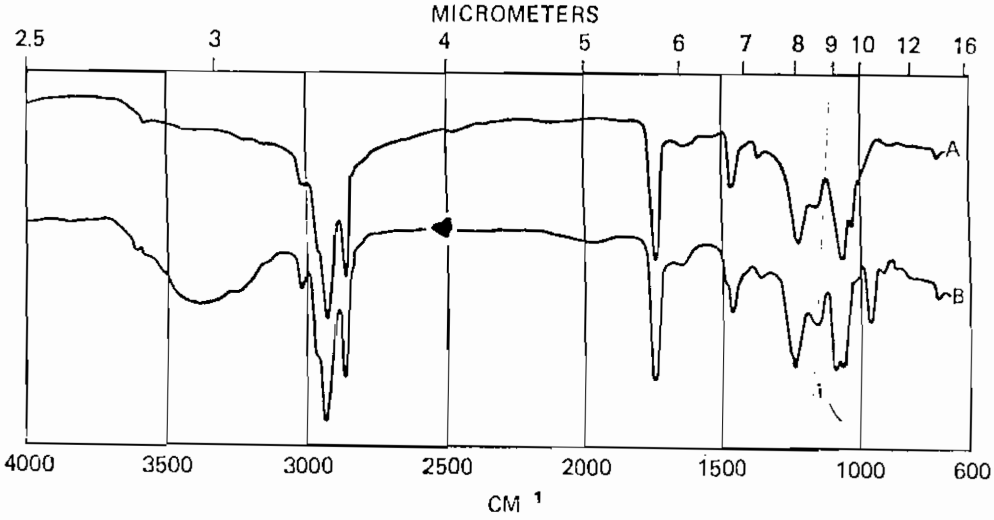
The spectra of lipids : طيف الليبيدات

يبين الجدول فى الصفحة التالية : الامتصاص لمعظم أقسام الليبيدات الشائعة وعلاقة ذلك بالتركيب الكيماوى لها . والشكل التالى يظهر جميع المنحنيات الامتصاصية التى تدل على وجود امتصاص قوى عند مدى طول موجى ٢٧٥٠ - ٣٠٠٠سم$^{-1}$ وذلك لوجود عدد كبير من مجاميع الميثلين والميثايل - كما يحدث أيضا إمتصاص ما بين الاطوال الموجية ١٣٠٠ - ١٥٠٠ سم$^{-1}$ خاصة اذا كانت مجاميع الميثيلين والميثايل فى الصور Deformation وتعطى المركبات التى تحتوى $(CH_2)_n$ حيث تكون n اكبر من ٤ إمتصاص قوى عند ٧٢٠ سم$^{-1}$ وهذا الامتصاص يظهر فى منحنيات الامتصاص لاغلب الليبيدات ، وفى المركبات المتبلورة والتى تحتوى على ذرات كربون فى سلاسل مستقيمة تعطى عدة امتصاصات فى المدى ١١٨٠ - ١٣٥٠ سم$^{-1}$ وأن عدد الامتصاصات يعتمد على طول السلسلة .



The IR spectra of: *A*, the fatty acids resulting from the saponification of olive oil (5% solution in CCl_4); *B*, the methyl esters of the fatty acids from egg yolk (5% solution in CCl_4); *C*, methyl elaidate (10% solution in CCl_4); *D*, cholesterol (5% solution in CCl_4).

والشكل (E) يبين منحنى الامتصاص للكولستيرول والذى يبين إمتصاص عند ٣٦٢٠سم-١ للرابطة غير الايدروجينية لمجموعة OH . ويدل الامتصاص عند ٣٣٥٠سم-١ على الرابطة الإيدروجينية داخل الجزىء وأن كثافة الامتصاص عند هذه الاطوال الموجية يدل على تركيزها النسبى .



The IR spectra of *A*, phosphatidylethanolamine; *B*, phosphatidylcholine (4% solutions in CCl_4; isolated from egg yolk by silicic acid chromatography).

ويظهر امتصاص واضح عند طول موجة ١٠٤٥ سم-١ يميز وجود OH للرابطة C-O ويرجع الامتصاص العريض ما بين ٣١٠٠ - ١٠٤٥سم-١ للفوسفاتيديل كولين والاسفنجوميلين الى ارتباط جزئى من الماء مع مجموعة CH من مجموعة الكولين و H+ من الفوسفات وتمتص مجموعة الكربونيل C = O للاسترات بقوه على ١٧٤٠ سم-١ .

وتمتص مجموعة الكربوكسيل للاحماض الدهنية الحرة على ١٧١٠ سم-١ وعلى ذلك نستطيع اكتشاف وجود الاحماض الكربوكسيلية فى الاسترات بواسطة الاشعة تحت الحمراء .

تمتص مجموعة الكربونيل للألدهيدات والكيتونات فى المدى ١٨٠٠ - ١٦٥٠سم-١ وحيث أن موضع الامتصاص بالضبط يعتمد على التركيب المحيط بالمجموعة فأن هذا يفيد جدا فى التعرف على التركيب الكيماوى لمجموعة الكربونيل فى مجموعة الاميد حيث تمتص على ١٦٤٠سم-١ وهذا يظهر بوضوح فى منحنى الامتصاص مثل السفنجوميلين والسربروسيدات ويعرف هذا الامتصاص باسم Amide I band ويكون مصحوبا بامتصاص آخر عند ١٥٥٠سم-١ مميز لمجموعة NH ويسمى Amide II band وأن وجود هذه الامتصاصات مع عدم وجود إمتصاص عند ١٧٤٠سم-١ يدل على وجود سفنجوليبيدات .

ويكشف عن عدم التشبع بواسطة C-H بالامتصاص بالقرب من ١٠٢٠سم-١ وفى حالة الروابط الزوجية المخالفه فانها تمتص على ١٠٠٠ - ٩٥٠سم-١ وهذا يكون واضحا من إمتصاص ميثايل اليادات وهذا يبين بوضوح ان الامتصاص فى منطقة IR يعطى معلومات وافية عن عدم التشبع والمتشابهات الفراغية لها .

تمتاز كل الفوسفوليبيدات بأن تمتص بشدة ما بين ١٢٠٠ - ١٢٥٠سم-١ وهذا يرجع الى P = O (شكل E) ومكان الامتصاص هذا يعتمد على الرابطة الايدروجينية فتمتص الفوسفاتيديل كولين (P = O) عند ١٢٤٣سم-١ وفوسفاتيديل إيثانول أمين على ١٢٢٥سم-١ وتمتص استرات الفوسفات نتيجة لوجود C-O-P بشدة ما بين ١٠٠٠ - ١١٠٠سم-١ وتمتص كل الفوسفوليبيدات التى تحتوى على كولين عند ٩٧٠سم-١ .

من الامتصاصات السابق ذكرها يلاحظ أن طيف الاشعة تحت الحمراء يعطى معلومات كثيرة عن تركيب الجزئى بالمقارنة بطيف الاشعة المرئية وفوق البنفسجية .

تم بحمد الله

References

1. Allen, J.C. and Hamilton, R.J. (1983). Rancidity in foods. Applied Sciences publishers, London and New York.

2. American Oil Chemists' Society (1987). Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Soc., 3rd ed. American Oil Chemists' Soc., Champaign, IL.

3. Barrett, C.B., Dellas, M.S.J. and Padley, F.B. (1962)). Chem. Ind.(London) p 1050

4. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification . Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911.

5 - Brockerhoff, H. (1967) . J. Lipid Res. 8 : 167.

6. Brockerhoff, H., Hoyle, R.G. and Hwang, P.C. (1966). Can. J. Biochem. 44 : 1519.

7. Christie, W.W. and Moore, J.H. (1969).A semimicro method for the stereospecific analysis of triglycerides. Biochim. Biophys. Acta 167 : 445.

8. deVries, B. (1962).Chem. Ind. (London) p 1049.

9. Farag, R.S., Youssef, A.M., Ewies, M.A. and Hallabo, S.A.S. (1978). Long chain fatty acids of six pollens collected by honeybees in Egypt. J. Apic. Res. 117 : 100 - 104 .

10. Farag, R.S., Samad, A.A. and El - Rafey, H.H.A. (1980). Research Bull. No. 1283. Faculty of Agriculture, Ain Shams University.

11. Farag, R.S., Ahmed, A.I., Rashad, S.E. and Ewies, M.A. (1980). Unsaponifiable matter of six pollens collected by honeybees in Egypt. J. Apic. Res. 19: 248 - 254.

12. Farag, R.S., Youssef, A.M., Khalil, F.A. and Taha, R.A. (1981). The Lipids of various fungi grown on an artificial medium. J. Am. Oil Chemists' Soc. 58 : 765 - 768 .

13. Farag, R.S., Youssef, A.M., Sabet, K.A., Fahim. M.M. and Khalil, F.A. (1981). Chemical studies on corn embryos infected by various fungi. J. Am. Oil Chemists' Soc. 58 : 722-728.

14. Farag, R.S., Abo - Raya, S.H., Ahmed, F.A., Hewedi, F.M. and Khalifa, H.H. (1983). Fractional crystallization and gas chroma tographic analysis of fatty acids as a means of detecting butterfat adulteration. J. Am. Oil Chemists' Soc. 60: 1665- 1669.

15. Farag, R.S., Hallabo, S.A.S., Hewedi, F.M. and Basyony, A.E. (1986). Chemical evaluation of rapeseed. Fette Seifen Anstrichmittel 88 : 391 - 397 .

16. Frank, J.W. (1963). Standard Methods of Chemical Analysis Industrial and Natural Products and Non-Instrumental Methods. Vol. II, part B. Van Von Nostrand Company Inc., Princeton, New Jersey, Toronto, London.

17. Gunstone, F.D., Hamilton, R.J. and Qureshi, M.I. (1965). J. Chem. Soc. London, p 319 .

18. Hilditch, T.P. and Scavell, A. (1950). J. Oil Colour Chem. Ass. 33:24.

19. Hiditch T.P. And Williams P.N. (1964). " The Chemical Constitution of Natural Fats 4th ed., pp 700 - 701. Chapman & Hall, London.

20. Hill. E.E., Husbands, D.R. and Lands, W.E.M (1968) . J. Biol. Chem. 243 : 4440.

21. Johnson, A.R. and Davenport, J.B. (1971). Biochemistry and Methodology of lipids. Interscience, New York, London, Sydney, Toronto.

22. Kartha. A.R.S. (1953). J. Am. Oil Chemists' Soc. 30: 280.

23. Kates, M. (1972). Techniques, of lipidology, Isolation, Analysis and Identification of lipids, North Holland Publishers, Co. Amsterdam.

24. Knight, J.A., Anderson, S. and Rawle, J.M. (1972). Chemical basis of the sulfo - phospho - vanillin reaction for estimating total serum lipids. Clinical Chem. 18: 199 - 202.

25. Lands, W.E.M., Pieringer, R.A., Slakey. P.M. and Zschocke, A. (1966). Lipids 1 : 444.

26. Litchfield, C. (1972). Analysis of triglycerides. Academic Press, Inc., New York and London.

27. Luddy, F.E., Barford, R.A., Herb, S.F., Magidman, P, and Riemenschneider, R.W. (1964) . J. Am. Oil Chemists' Soc, 41 : 693.

28. Plummer, D.T.(1971). An introduction to practical biochemistry. Mc Graw - Hill Book Company (UK) Limited.

29. Perkins, E.G. (1975). Analysis of lipids and lipoproteins. Published by American Oil Chemists' Society.

30. Von Rudloff, E. (1956). Can. J. Chem. 34 : 1413.

قائمة بالجداول

الجدول	العنوان	الصفحة
١	خصائص المذيبات الشائعه في تحليل الليبيدات	٢٥
٢	الخصائص الطبيعية والكيماوية لبعض الدهون والزيوت	٤٣
٣	حدود أوزان الزيوت والدهن عند تقدير رقم الحموضة	٥٣
٤	حدود أوزان الزيوت والدهون عند تقدير الرقم اليودي	٦٠
٥	حدود أوزان الزيوت والدهون عند تقدير الرقم الايدروكسيل	٦٣
٦	الخصائص المميزة التي تستخدم للتعرف علي زيوت ودهون معينه	٦٤
٧	خصائص المشتقات البروميه لبعض الأحماض الدهنية الغير مشبه	٧٠
٨	النسبه المئوي للأحماض الدهنيه في بعض الزيوت والدهون الشائعه	٧٣
٩	تركيب الاحماض الدهنية لحبوب اللقاح لعائلات نباتيه مختلفة	٧٤
١٠	النسبة المئوية لمكونات المواد غير المتصبنة في ليبيدات بعض حبوب اللقاح	٧٥
١١	النسبة المئوية والنسب ما بين الهيدروكربونات والاستيرولات الكلية لحبوب اللقاح	٧٦
١٢	تركيب الاحماض الدهنية لبعض الفطريات	٧٦
١٣	النسبة المئوية لمكونات المواد غير المتصبنه في ليبيدات بعض الفطريات	٧٧
١٤	الطرق المستخدمه لتقدير ثبات الزيوت والدهون	٨٤
١٥	كيفية الحساب لكمية الاكسوجين المتص	٩٤
١٦	الاحماض الدهنية والجلسريدات الناتجة من عملية البلورة المتتابعة	١٢٩
١٧	التغير في النسب المئوية للاحماض الدهنية الشائعة في السمن البقرى ، الخنزير، السمن الصناعي والعينات المخلوطة الناتجة من عملية البلورة الجزئية	١٣٥
١٨	التغير في النسب المئوية للأحماض الدهنية الشائعة في السمن الجاموسي الخنزير، السمن الصناعي والعينات المخلوطة الناتجة من عملية البلورة الجزئية	١٣٦
١٩	أرقام بومر لخلط السن الجاموس بدهون الخنزير والسمن الصناعي	١٣٧
٢٠	أرقام اليودي – ديخرت – بولينسكي – كرشنر لبعض الزيوت والدهون الحيوانيه	١٤٢
٢١	أرقام اليودي – ديخرت – بولينسكي – كرشنر لبعض الزيوت والدهون الحيوانيه	١٤٢
٢٢	الانظمة المختلفة من المذيبات لفصل الجلسريدات الثلاثية التي تختلف في درجة عدم التشبع	١٤٨
٢٣	تدرج القطبيه لاستخلاص الجلسريدات الثلاثية	١٥١
٢٤	أرقام الكربون لبعض استرات الاحماض الدهنية الشائعه	١٨٤
٢٥	قيم الامتصاص للكروموفورات الغير متبادلة	١٩٠
٢٦	قيم الامتصاص للكروموفورات الغير متبادلة	١٩١
٢٧	نوعية الاهتزازت لمجموعة CH في البروبان واقصي امتصاص لها	١٩٦

بسم الله الرحمن الرحيم

نبذة عن المؤلف

* حصل علي بكالوريوس في العلوم الزراعية " شعبة كيمياء حيوية " (١٩٦٣) وحصل علي درجة الماجستير في العلوم الزراعية " كيمياء حيوية " من كلية الزراعة جامعة القاهرة (١٩٦٦) - ثم حصل علي دكتوراه في فلسفة العلوم الكيميائية من جامعة لندن (١٩٧٤) بالمملكة المتحدة .

* عضو هيئة التدريس بكلية الزراعة جامعة القاهرة حيث كان معيدا بقسم الكيمياء الحيوية (١٩٦٣) ، تدرج بسلك الوظائف حتي عين استاذا بقسم الكيمياء الحيوية (١٩٨٤) ثم رئيسا لقسم الكيمياء الحيوية (١٩٨٨) - مدير المعمل المركزي الرئيسي بكلية الزراعة جامعة القاهرة - استاذا زائرا لجامعة كلسترتون بانجلترا (١٩٧٨ - ١٩٨٠) - عضوا في الجامعة الكيميائية الامريكية للزيوت - عضوا في لجنة التحرير والنشر بالمجلة العلمية بكلية الزراعة جامعة القاهرة ولجنة التحرير والنشر بالمجلة الطبية المصرية الجديدة - عضوا في الهيئة المصرية العامة للتوحيد القياسي وجودة الانتاج - عضوا بلجان تحكيم الأبحاث العلمية للمجلات المتخصصة - عضوا في مجلس ادارة مركز التحاليل الدقيقة بجامعة القاهرة - اختير عضوا في الجمعية الامريكية لتقدم العلوم (١٩٩٢) - اختير عضوا في الجمعية الدولية لكيمياء الحبوب (١٩٩٣) .

* شارك في عدة مؤتمرات وندوات علمية عالمية ومحلية بالقاء محاضرات في المؤتمر العالمي الثالث عن اكسدة الليبيدات بفرنسا (١٩٧٣) - المؤتمر القومي الأول (١٩٨١) والثاني (١٩٨٥) والرابع (١٩٩٢) للكيمياء الحيوية بمصر - المؤتمر الدولي عن الجديد في تكنولوجيا الغذاء لحفظه وتوفيره (١٩٨١) - ندوة عن الملتقي العلمي حول انتاج الزيوت باكاديمية البحث العلمي والتكنولوجيا (١٩٩١) - ندوة علمية عن زيت النخيل بمعهد التغذية (١٩٩١) - اعياد العلم بسوريا الثاني والثلاثون (١٩٩٢) والثالث والثلاثون (١٩٩٣) - مؤتمر جماعة البحث العلمية الالمانية (١٩٩٢) .

* اختير بصفته الشخصية لاعطاء محاضرات عن الزيوت العطرية بموسكو (١٩٨٧) ومحاضرات عن التحليل الكروماتوجرافي ممثلا لشركة باي يونيكام (١٩٨٩) - اختير ضمن اعضاء الوفد المصري المشارك في اللقاء المصري الفرنسي حول مواصفات زيت الشلجم (١٩٨٧) - اختير ضمن شخصيات الموسوعة القومية التي ساهمت بدور بارز في شتي مجالات الحياة المصرية والتي اصدرتها الهيئة العامة للاستعلامات الطبعة الاولي (١٩٨٩) والطبعة الثانية)١٩٢٩) - اختير كاستاذ محاضر في المؤتمر العالمي الخامس عن وقاية الاغذية المحفوظة بفرنسا (١٩٩٠) - اختير بواسطة اكاديمية العالم الثالث ممثلا عن الدول النامية لحضور المؤتمر العالمي السابع لتلوث البيئة بامريكا (١٩٩١) . اختير كاستاذ محاضر وضيفا متميزا في مؤتمر الزيوت العطرية الذي نظمته شركة يونج ليفينج بولاية يوتا الامريكية (١٩٩٤) .

* كون مدرسة علمية متميزة في مجال الزيوت والدهون وبلغ عدد الذين اشرف عليهم في دراستهم لدرجتي الماجستير والدكتوراه اكثر من ٦٥ طالبا . قام بنشر اكثر من ٩٥ بحثا علميا مبتكرا وبصفة خاصة في مجال الزيوت والدهون في المجلات العلمية العالمية الامريكية والاوروبية والمصرية . من مؤلفاته : عدد ٢ كتاب وهما :

١ - " التحليل الكروماتوجرافي " (رقم الايداع : ١٩٩٠/٧٨١٧) .

٢ - " كيمياء الليبيدات " (رقم الايداع : ١٩٩١/٣٥٧٥) .

اسند اليه مراجعة كتابي :

* " تحاليل كيميائية وفيزيائية " لمركز التعليم المفتوح بجامعة القاهرة (١٩٩٣) .

* " زيوت الطعام واستخداماتها " لمركز الترجمة بجامعة الملك سعود (١٩٩٣) .

* حاصل علي جائزة الدولة التشجيعية ووسام العلوم والفنون من الطبقة الاولي عام ١٩٧٨ ثم مرة اخري عام ١٩٨٤ . رشح بواسطة جامعة القاهرة للحصول علي جائزة الدولة التقديرية (١٩٩١) .

رقم الإيداع : ١٠٦٤٩ / ١٩٩٤

عربية للطباعة والنشر

٧ ، ١٠ شارع السلام - أرض اللواء المهندسين

تليفون : ٣٠٣١٠٤٣ـ٣٠٣٦٠٩٨